

**Molekulare Untersuchungen zur Innenohrmorphogenese  
bei der Maus (*mus musculus*)**

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

genehmigte  
Dissertation

von  
Silke Rinkwitz  
aus  
Bremen

Hauptreferentin: PD Dr. Eva Bober

Korreferent: Prof. Dr. H. G. Wolff

Eingereicht am: 26.02.1998

Mündliche Prüfung am: 30.04.1998

## **Vorabveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, Privatdozentin Dr. Eva Bober, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Publikationen**

Rinkwitz-Brandt, S., Arnold, H. H. and Bober, E. (1996). Regional expression of *Nkx-5.1*, *Nkx-5.2*, *Pax-2* and *sek* genes during inner ear development. Hearing Research 99, 129-138.

Rinkwitz-Brandt, S., Justus, M., Oldenettel, I., Arnold, H. H., Bober, E. (1995). Distinct temporal expression of mouse *Nkx-5.1* and *Nkx-5.2* homeobox genes during brain and ear development. Mechanisms of Development 52, 371-381.

### **Tagungsbeiträge**

Rinkwitz-Brandt, S., Arnold, H.H. and Bober, E..Expression of *Nkx5* genes in mouse mutants with inner ear defects. 13th International Congress of Developmental Biology, Snowbird (Utah, USA), 5.-10. Juli 1997. Poster Abstract. Developmental Biology Vol 186, page 334.

Rinkwitz-Brandt, S., Arnold, H. H. and Bober, E.. Differential expression of the mouse *Nkx5* genes during inner ear development, analysis of gene expression in inner ear mutants. 12. Tagung der Gesellschaft für Entwicklungsbiologie, Köln, 11.-14. März 1997. Poster Abstract, S. 120.

Rinkwitz-Brandt, S., Arnold, H.-H. and Bober, E.. Differential expression of the mouse *Nkx-5* genes during inner ear development. Congress of the European Developmental Biology Organisation, Toulouse, 09-13.07.95. Poster abstract, page 93.

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	IV
Zusammenfassung	VI
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>9</b>
<b>2.1 Material</b>	<b>9</b>
2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	9
2.1.2 Stammlösungen, gepufferte Salzlösungen und Kulturmedien	10
2.1.2.1 Stammlösungen	10
2.1.2.2 gepufferte Salzlösungen	10
2.1.3 Antibiotika	11
2.1.4 Sterilisation von Lösungen und Geräten	12
2.1.5 Bakterienstämme	12
2.1.6 Die für <i>in situ</i> und <i>whole mount</i> Hybridisierungen verwendeten Proben	12
2.1.7 Verwendete Oligonukleotide	13
2.1.8 Mausstämme	14
<b>2.2 Methoden</b>	<b>14</b>
2.2.1 Vervielfältigung und Präparation von Plasmid-DNA	14
2.2.1.1 Herstellung kompetenter Zellen nach der PEG-Methode	14
2.2.1.2 Transformation und Aufreinigung der Plasmid-DNA	15
2.2.2 Reinigung von DNA/RNA mittels Alkoholpräzipitation	15
2.2.3 Konzentrationsbestimmung von wässrigen Nukleinsäurelösungen	16
2.2.4 Horizontale Agarosegelelektrophorese	17
2.2.5 Herstellung der Matrizen für die Synthese von RNA-Sonden	18
2.2.6 <i>In situ</i> Hybridisierung	19
2.2.6.1 Herstellung der Hybridisierungsprobe	19
2.2.6.2 Hybridisierungsprotokoll	20
2.2.6.3 Autoradiographie	22
2.2.6.4 Mikroskopie/Fotografie	23
2.2.7 <i>Whole mount in situ</i> Hybridisierung	23
2.2.7.1 Herstellung der Hybridisierungsprobe	24
2.2.7.2 Hybridisierung der Embryonen	24
2.2.7.3 Abschließende Waschschrte und Histochemie	26
2.2.7.4 Mikroskopie/Fotografie	26
2.2.8 Vibratomschnitte	27

2.2.9	Paraffinschnitte	27
2.2.10	Hämatoxylin/Eosin-Färbung	29
2.2.11	Entnahme von Embryonen	29
2.2.12	Präparation der Innenohrepithelien	30
2.2.13	Das Organkultursystem	30
2.2.13.1	Aufbau des Organkultursystems	30
2.2.13.2	Verwendete Kulturmedien und Kultivierungsbedingungen	32
2.2.13.3	Zugabe von Antisense-Oligonukleotiden zum Kulturmedium	33
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	34
<b>3.1.</b>	<b>Genexpression im sich entwickelnden Innenohr der Maus</b>	34
3.1.1	Genexpression während der Determinierungsprozesse der Ohranlage	35
3.1.1.1	Die frühe Expression des Homeoboxgenes <i>Nkx5-1</i>	35
3.1.1.2	Die frühe Expression der Gene <i>Pax-2</i> und <i>Sek</i>	38
3.1.2	Genexpression während der Differenzierungsprozesse im Innenohr	40
3.1.2.1	Expression der <i>Nkx5-1</i> und <i>Nkx5-2</i> Gene im vestibulären Apparat	41
3.1.2.2	Vergleich der Expressionsmuster der <i>Nkx5-1/5-2</i> , <i>Pax-2</i> und <i>sek</i> Gene im E17.5 Innenohr	43
3.1.2.3	Genexpression im Ductus cochlearis	46
3.1.2.4	Tabellarische Zusammenfassung der Expressionsdomänen im differenzierenden Innenohr	48
<b>3.2</b>	<b>Genexpression im Innenohr von Hinterhirn-Mausmutanten</b>	50
3.2.1	Untersuchung der <i>Nkx5-1</i> Genaktivität in <i>Hoxa-1</i> <sup>-/-</sup> Mausmutanten	50
3.2.2	Die <i>plotch</i> - Mutante	51
3.2.2.1	<i>Nkx5-1</i> Genexpression in <i>plotch</i> Embryonen	52
3.2.2.2	<i>Pax-2</i> Genexpression in <i>plotch</i> Embryonen	54
3.2.2.3	<i>Trp2</i> Expression in <i>plotch</i> Mutanten	54
<b>3.3</b>	<b>Genexpression in der Innenohr-Mausmutante <i>fidget</i></b>	58
3.3.1	<i>Nkx5</i> Genexpression im Innenohr von <i>fidget</i> Mutanten	59
3.3.2	<i>Msx-1</i> Expression im Innenohr von <i>fidget</i> Mutanten	61
3.3.3	Expression des Fibroblasten Wachstumsfaktor Rezeptor 2 ( <i>FGFR-2</i> ) Gens im <i>fidget</i> Innenohr	64
<b>3.4</b>	<b>Untersuchung der Innenohrmorphogenese im <i>in vitro</i> Kultursystem</b>	66
3.4.1	<i>In vitro</i> Kultivierung von Otocysten aus E12.5 und E13.5 Mausembryonen	66
3.4.1.1	Optimierung der Kultivierungsbedingungen	67
3.4.1.2	Die Morphologie der <i>in vitro</i> kultivierten Innenohren	68
3.4.1.3	In <i>in vitro</i> kultivierten Innenohren ist spezifische	70

	Genaktivität nachweisbar	
3.4.2	<i>In vitro</i> Kultivierung von isolierten Sinnesepithelien	72
3.4.2.1	Optimierung der Kultivierungsbedingungen	72
3.4.2.2	Nachweis spezifischer Genexpression in den <i>in vitro</i> kultivierten Sinnesepithelien	72
<b>3.5</b>	<b>Modifikationen im Innenohr-Organkultursystem. Zugabe von Pax-2</b>	<b>73</b>
	<b>Antisense-Oligonukleotiden zur Inhibierung der Pax-2 Genfunktion <i>in vitro</i></b>	
3.5.1	Kultivierungsbedingungen	74
3.5.2	Die Verteilung der Oligonukleotide im kultivierten Innenohr	74
3.5.3	Der Effekt der Oligonukleotide auf die Innenohrentwicklung <i>in vitro</i>	75
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>79</b>
<b>4.1</b>	<b>Überblick</b>	<b>79</b>
<b>4.2</b>	<b>Die spezifische Expression von Genen im sich entwickelnden Innenohr der Maus</b>	<b>80</b>
4.2.1	Innenohrspezifische Genexpression in Kompartimenten der Ohranlage	80
4.2.2	Expression im cochleären Gang	84
<b>4.3</b>	<b>Analyse der Genexpression in Mausmutanten</b>	<b>86</b>
4.3.1	Die Aktivität des Nkx5-1 Gens ist unabhängig von Signalen aus dem sich entwickelnden Hinterhirn	86
4.3.2	In homozygoten <i>plotch</i> Embryonen wandern keine Melanoblasten in die Ohranlage ein	88
4.3.3	Die Expression vestibulär exprimierter Gene in der Gleichgewicht-Mausmutante <i>fidget</i>	90
<b>4.4</b>	<b>Ein Innenohr <i>in vitro</i> Kultursystems zur Untersuchung der Funktion und Regulation von Genen</b>	<b>92</b>
<b>5.</b>	<b>Literatur</b>	<b>98</b>
<b>6.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>108</b>

## Abkürzungen

A	Absorption
Abb.	Abbildung
Amp.	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
bzw.	beziehungsweise
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
CTP	Cytosintriphosphat
d	Tag/Tage
Dev.	Development
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
E	Embryonaltag
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et altera (und andere)
FCS	Foetal calf serum (Foetales Kälberserum)
g	Gramm
GTP	Guanintriphosphat
h	Stunde
H/E	Hämatoxylin/Eosin
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
m	milli
M	molar (mol/l)
min	Minute/Minuten
μ	micro
μg	microgramm
μl	microliter
μm	micrometer
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
N&T	Neuman and Tytell
NBT	4-Nitro blue tetrazoliumchlorid
p. a.	pro analyse
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung

Pax	Paired Box
pH	Potential Hydrogenium ( $-\log (H_3O^+)$ )
PK	Proteinase K
pn	postnatal
RNase	Ribonuklease
RNasin	RNase Inhibitor
rpm	Runden pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SSC	Standard-Citratlösung
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
SW	Schwarzweiß
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit (Einheit; Maß für die Enzymaktivität)
UTP	Uraciltriphosphat
Vol	Volumen/Volumina
WT	Wildtyp



## Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Genexpressionsmuster zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Innenohrmorphogenese der Maus, während der normalen Entwicklung und unter veränderten *in vivo* und *in vitro* Situationen, bestimmt und vergleichend analysiert.

Die Expressionsanalyse bezog sich auf Gene, die potentiell eine regulatorische Rolle in der Transkription, wie die Homeoboxgene *Nkx5-1* und *Nkx5-2* und das "paired box" Gen *Pax2* oder in der Übermittlung von Signalen zwischen den Zellen, wie das Tyrosinkinase Rezeptorgen *sek*, ausüben und somit bei embryonaler Musterbildung und/oder Zellspezifizierung im Innenohr wichtig sein können. Es zeigte sich, daß *Nkx5-1*, beginnend am Embryonaltag 8.5 (E8.5), ein dynamisches Expressionsmuster in Plakoden- und Ohrvesikelstadien aufweist. *Nkx5-2* wird in Ohrstrukturen erst am E13.5 aktiviert. Ab diesem Stadium weisen beide *Nkx5* Gene eine identische, auf das vestibuläre, nicht-sensorische Epithel begrenzte Transkriptenverteilung auf. Später markieren sie zusätzlich eine definierte Struktur in der Cochlea, die Stria vascularis. *Pax2* Transkripte wurden im ventralen Teil der Ohranlage, der Ursprung für die Cochlea gibt, gefunden. Nach der abgeschlossenen Morphogenese waren *Pax2* Transkripte, übereinstimmend mit seiner frühen, ventralen Expression, im Epithelium der Cochlea und des Sacculus mitsamt der sensorischen Bereiche zu finden. Das *sek* Gen wurde in nahezu allen Bereichen des Innenohrs, die *Nkx5-1* negativ waren (sensorisches Epithel des vestibulären Apparates, cochleäres Epithel ausschließlich der Stria vascularis und mesenchymales Gewebe), detektiert. Dieser Befund deutet auf mögliche, inhibitorische Wechselwirkungen zwischen den Expressionsdomänen beider Gene hin.

Ausgehend von der hier bestimmten Verteilung der Gentranskripte in Wildtyp Embryonen wurden vergleichende Expressionsanalysen in verschiedenen Innenohrmutanten der Maus vorgenommen. Dabei wurden Mausmutanten mit primären Innenohrdefekten (*fidget*) und solche, deren Innenohrdefekte auf Hinterhirnmißbildungen zurückzuführen sind (*splotch*, *Hoxa-1*) untersucht. Ziel war es, Gene zu identifizieren, die durch die Mutation in ihrer Expression verändert werden und somit funktionelle Zusammenhänge bzw. Signalwege, die zur Ausbildung der in den Mutanten gestörten Strukturen führen, aufzuzeigen. Insbesondere sollte die Analyse beider Mutantengruppen Hinweise über mögliche autonome (innerhalb des Innenohrs) oder externe (hier: hinterhirnabhängig) Signale liefern, die die Aktivität des *Nkx5-1* Gens beeinflussen. Die Analyse der Hinterhirnmutanten zeigte, daß die Aktivität des *Nkx5-1* Gens nicht durch die die Innenohrentwicklung steuernden Signale aus dem Hinterhirn reguliert wird. Die *Nkx5-1* Expression entsprach in den *splotch* und *Hoxa-1* <sup>-/-</sup> Mutanten der normalen Wildtyp-Verteilung. In der Innenohrmutante *fidget* konnte ebenfalls keine Veränderung der *Nkx5-1* Expression festgestellt werden. Obwohl die in der *fidget* Mutante betroffenen vestibulären Strukturen mit den Expressionsdomänen des *Nkx5-1* Gens korrelieren,

ren, konnte hier nahezu ausgeschlossen werden, daß das *Nkx5-1* Gen direkt oder auch indirekt, über zwischengeschaltete Moleküle, durch das *fidget* Gen reguliert wird. Weitere, hier untersuchte, vestibulär exprimierte Gene, *Nkx5-2*, *Msx-1* und *FGFR-2*, werden im sich entwickelnden Innenohr der *fidget* Mutante ebenfalls unverändert exprimiert.

Für die *splotch* Mutante wurde neben dem Hinterhirndefekt eine fehlende Einwanderung der Melanoblasten in die Stria vascularis postuliert. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden *in situ* Hybridisierungen mit dem Melanoblasten-spezifischen Markergen *Trp2* auf Innenohrschnitten der *splotch* Mutanten durchgeführt. Diese Daten zeigten, daß in *splotch* Mausmutanten keine Einwanderung von Melanoblasten in das Innenohrepithel stattfindet.

Parallel zu den Expressionsanalysen in wildtyp und mutanten Mäusen, wurde ein Innenohr *in vitro* Kultursystem optimiert. In diesem *in vitro* Modell werden einzelne Schritte der Innenohrmorphogenese nachgestellt. Hier konnte demonstriert werden, daß die *in vivo* charakterisierten Genexpressionsmuster unter *in vitro* Bedingungen in Organ- und Organ-ähnlichen Kulturen nachvollziehbar sind. Verschiedene, modifizierende Bedingungen und funktionelle Anwendungen dieses *in vitro* Modellsystems wurden untersucht und diskutiert.

## 1. Einleitung

Das Ohr ist als eines der primären Sinnesorgane von Säugetieren seit langem Gegenstand intensiver Untersuchungen. Es beinhaltet neben dem Hör- auch den Gleichgewichtssinn. Die Studien konzentrierten sich bislang vorwiegend auf neurophysiologische Fragestellungen sowie die Beschreibung des anatomischen Aufbaus des Innenohres. Im entwicklungsbiologischen Bereich sind die molekularen Grundlagen, die zur Ausbildung dieses hochkomplexen Organs führen, trotz umfangreicher morphologischer Analysen (Sher, 1971; Van De Water & Represa, 1991; Martin und Swanson, 1993) nur in den Ansätzen untersucht.

Äußerlich sichtbar ist nur die Ohrmuschel, die der Aufnahme von Hörsinnesreizen dient. Das eigentliche Sinnesorgan, das Innenohr, ist als ein knöchernes Labyrinth tief in den Schädelknochen eingebettet (Abbildung 1).



**Abbildung 1. Äußeres Ohr, Mittel- und Innenohr in schematischer Darstellung (Schalleitung).**

Das knöcherne Labyrinth wird von einem häutigen Epithel ausgekleidet, welches neben dem Hörsinnesorgan in der Cochlea auch die Sinnesepithelien für den Drehsinn in den Bogenmägen und die Sinnesepithelien für den Schweresinn bzw. die lineare Beschleunigung im Utriculus und Sacculus enthält. Dieses sogenannte häutige Labyrinth schwimmt in einer lymphähnlichen Flüssigkeit, der Perilymphe. Im Innenraum wird es von der Endolymphe ausgefüllt, welche im vestibulären Apparat durch eine veränderte Raumlage und in der Cochlea durch den als Schwingung vermittelten Hörreiz (siehe Abb. 1) in Bewegung gerät und damit den Reiz für die spezialisierten Rezeptorzellen (Haarzellen) in den Sinnesepithelien erzeugt. Die Abbildung 2 zeigt und benennt die spezialisierten Strukturen des Innenohrs.

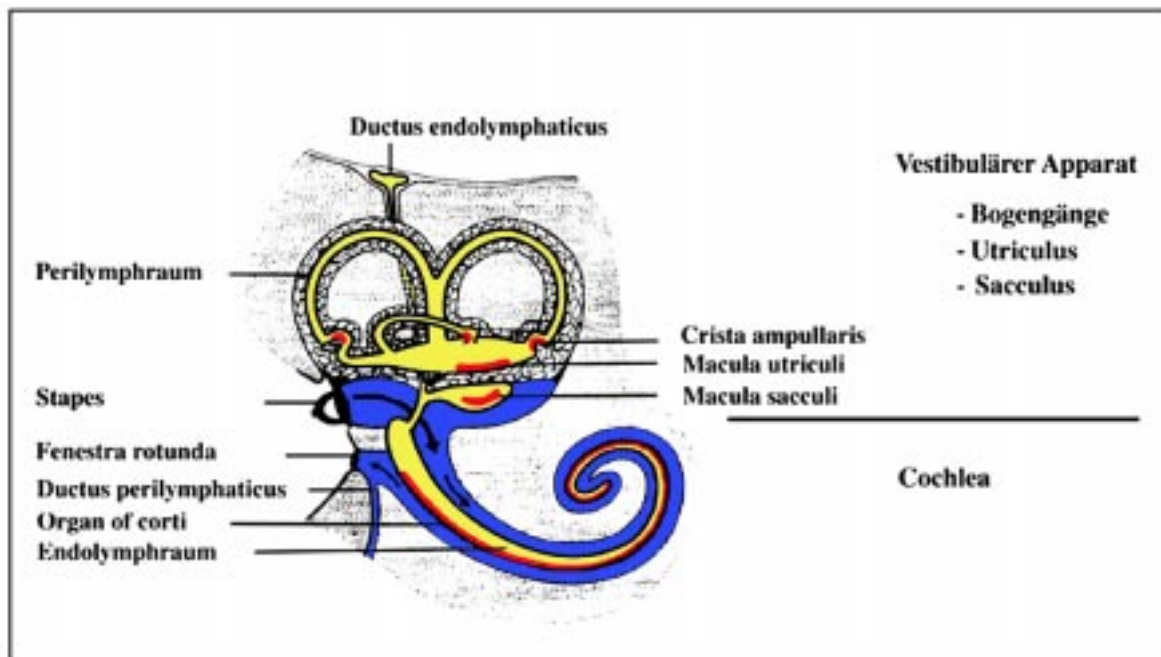


Abbildung 2. Schnitt durch das Innenohr in schematischer Darstellung, nach Bargmann (aus Thews et al, 1989)

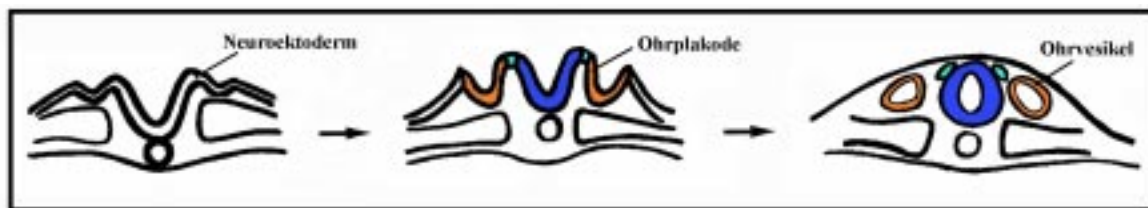
Molekulargenetische Studien am Innenohr wurden erstmals im Feld der Humanmedizin /Humangenetik zur Untersuchung erblich bedingter Innenohrerkrankungen durchgeführt. Da der funktionelle Ausfall eines Gens meistens zu ähnlichen Störungen bei Maus und Mensch führt, wird, um die biologische Basis der genetisch bedingten Krankheitsbilder zu untersuchen, die Maus als Modellsystem verwandt (Nadeau et al., 1991; Steel, 1991). Die Aufklärung der pathophysiologischen Mechanismen, welche einem Syndrom zugrunde liegen, sollen die Grundlage zur Erarbeitung neuer Therapieansätze stellen (Leppert, 1991; Waelsch, 1991).

Die Grundlagenforschung im Feld der molekularen Entwicklungsbiologie wendet sich erst seit kurzem der Innenohrentwicklung zu. Mechanismen, welche zur Ausdifferenzierung spezialisierter Strukturen des Innenohres führen, werden an Maus- und Hühnchenmodellen analysiert und die Funktion der an diesen Prozessen beteiligten Gene untersucht (siehe unten).

Die Ohrentwicklung beginnt bei der Maus am Embryonalentwicklungstag 8.0 (E8.0). Ausgelöst durch induktive Signale aus dem unterliegenden Mesoderm und der lateral angrenzenden Neuralplatte entstehen im Ektoderm zwei Areale, die Ohrplakoden, deren Zellen die beiden Innenohren des Embryos bilden. Zu demselben Entwicklungszeitpunkt bilden sich im angrenzenden Hinterhirn sieben Rhombomere, welche durch die spezifischen

Expressionsmuster einer Kombination von Genen charakterisiert werden (Lumsden & Krumlauf, 1996). Die Ohrplakoden sind zu beiden Seiten der Rhombomere 5 und 6 als Gewebeverdickungen sichtbar. Durch Zellproliferation und Umstrukturierungsprozesse formiert sich aus der Ohrplakode bis zum E9.5 der Otocyst, ein einschichtiges, von dichtem Mesenchym umgebenes, ovoides Bläschen (siehe Abbildung 3). Am E10.5 sind die Schicksale einzelner Otocystenteile trotz augenscheinlicher Homogenität der Vesikelwände bereits festgelegt. Die Existenz solcher regionalen Identitäten wurde im Rahmen von morphologischen Studien mittels *in vitro* durchgeführter "fate mapping" Experimente an E10.5/E11.5 Otocysten bewiesen (Li et al., 1978).

Mit Ausstülpungen des Vesikelepithels nach ventral als Anlage für die Cochlea und nach dorsal zur Bildung des vestibulären Apparates und des endolymphatischen Ganges beginnt die Ausbildung spezialisierter Strukturen des Innenohrs. Morphogenetische Ereignisse und Differenzierungsprozesse führen zu einem komplex gebauten Labyrinthsystem, welches auf kleinster Fläche eine Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen enthält.



**Abbildung 3. Invagination des presumptiven Innenohrepithels zum Ohrvesikel. (gelb) Ohrplakode, Ohrvesikel, (grün) Neuralleistenzellen, (blau) Neuralfalte, Neuralrohr**

Am E10.5 wird mit der Ausstülpung des dorsomedialen Vesikelepithels zum endolymphatischen Gang die Morphogenese eingeleitet. Einen Tag später zeigen sich erste Einschnürungen des Vesikelepithels zur Ausbildung des Vestibulären Apparates. Die Anlage der Cochlea wird am E12.5 als ventrale, hakenförmige Ausstülpung sichtbar. Bis zum E13.5 haben sich nacheinander der vordere, der hintere und der laterale Bogengang formiert und die Cochlea weist 1 1/4 Windungen auf (siehe Abbildung 4).

Am E14.5, nach Ausprägung der morphologischen Erscheinung des Innenohres, beginnt die Differenzierung der Sinnesepithelien und des cochleären Ganges. Diese Differenzierungsprozesse führen zur Spezialisierung einzelner Zellen und sind erst zehn Tage nach der Geburt abgeschlossen. Die Sinneszellen des Hör- und Gleichgewichtsorganes bilden eine komplexe Anordnung, in der die Position jeder einzelnen Zelle genau definiert ist.

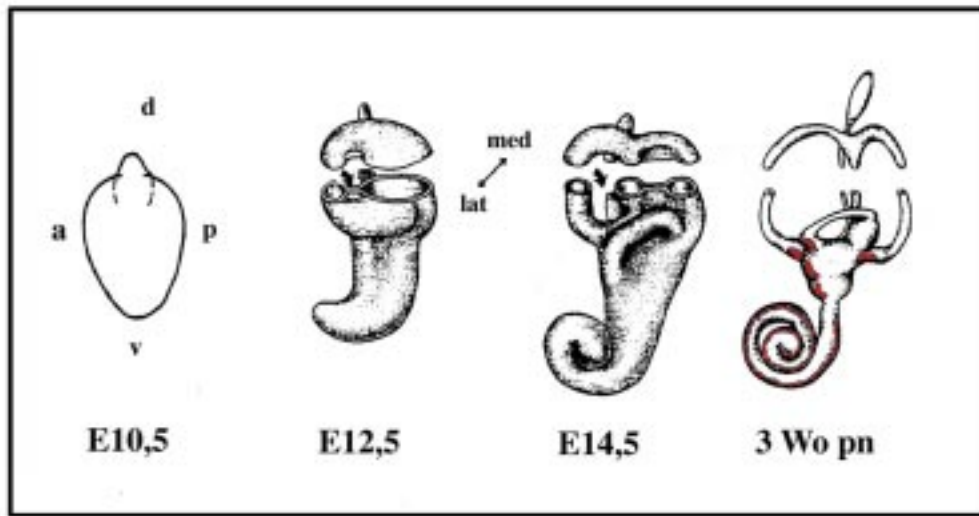


Abbildung 4. Morphogenese des Innenohrs, nach Martin & Swanson (1993)

Die Bildung des Ohrvesikels sowie anschließende Differenzierungsprozesse werden durch Signale aus dem sich benachbart entwickelnden Hinterhirn gesteuert. Ausgelöst durch diese Steuerungssignale werden Zielgene im sich entwickelnden Innenohr angeschaltet und die Zellen hierdurch determiniert. Fehlende Signale führen zu Störungen in der Innenohrentwicklung.

Die Existenz solcher, die Innenohrentwicklung kontrollierenden Signale aus der Neuralplatte und dem Neuralrohr wurde bereits vor 50 Jahren durch Transplantationsexperimente an Amphibien und Vögeln bewiesen (Detwiler, 1951; Yntema, 1959). Bei Säugetieren gaben experimentelle Befunde an Mausmutanten mit mißgebildeten Innenohren einen Einblick in die Ohrentwicklung. In einigen Mutanten, *kreisler*, *dreher*, *looptail* und *splotch*, sind die Innenohrdefekte mit Mißbildungen des Hinterhirns gekoppelt (Auerbach, 1954; Deol, 1964; Hertwig, 1944). Die *splotch* Mäuse weisen unterschiedlich starke Neuralrohranomalien auf und haben nur dann mißgebildete Innenohren, wenn auch das Hinterhirn betroffen ist. Basierend auf diesen Beobachtungen postulierte Deol, daß in den vier mutanten Mausstämmen die Innenohrdefekte sekundär, durch ein Fehlen induktiver Signale aus dem sich entwickelnden Hinterhirn, bedingt sind (Deol, 1966). Diese neuralen Signale im Mausembryo wurden in späteren Studien näher charakterisiert und die Quelle der induzierenden Signale identifiziert.

Molekularbiologische Studien an *kreisler* und *splotch* Mäusen zeigten, daß die betroffenen Gene nicht in der Ohranlage, aber im sich entwickelnden Hinterhirn exprimiert werden (Cordes und Barsh, 1994; Epstein, 1991; Goulding, 1991). Das *kreisler* Gen wird insbesondere in den Rhombomeren 5 und 6 im E8.5 Embryo exprimiert (Cordes & Barsh, 1994). Durch Expressionsanalysen mit rhombomeren-spezifischen Genen wurde nachgewiesen, daß

in dieser Mutante die Hinterhirnsegmentierung gestört ist und im Fehlen der dem Otocysten benachbarten Rhombomere 5 und 6 resultiert (Frohman et al., 1993; Mc Kay et al., 1994). Kürzlich wurde auch herausgefunden, daß in der *kreisler* Mutante die Aktivität eines innenohrspezifischen Moleküls herabgesetzt ist (Mc Kay et al., 1996). Die Existenz „ohrinduzierender“ Signale aus dem Rhombomer 5 konnte gleichsam durch die gezielte Inaktivierung des *Hoxa-1* Gens (Chisaka et al., 1992), das im Hinterhirn, in den Rhombomeren 4-7 aktiv ist, gezeigt werden. In *Hoxa-1* Mutanten fehlt das fünfte Rhombomer und diese Mäuse weisen eine der *kreisler* Maus ähnliche Innenohrmißbildung auf (Mark et al., 1993). *In vitro* Kulturen von Hinterhirn-Ohrvesikel Explanten bestätigten zudem einen kontinuierlichen Hinterhirneinfluß, der bis zum E12.5 wirksam ist (Van De Water & Represa, 1991).

In späteren Entwicklungsstadien, in denen sich das Innenohrepithel zur Bildung des vestibulären Apparates und der Cochlea ausstülpt, ist das den Ohrvesikel umgebende Mesenchym regulatorisch aktiv (Swanson et al., 1990; Martin & Swanson, 1993). Die Mechanismen der Innenohrmorphogenese wurden von Martin und Swanson am Beispiel der Bogen-gangsformation aufgezeigt. Zur Ausführung der Bewegungen löst sich das Ohrepithel vom unterliegenden Mesenchym, welches die Bewegungen mitvollzieht und den Ursprung für die knöcherne Kapsel des Labyrinths gibt. Dieser Prozeß wird durch Interaktionen zwischen dem Otocystenepithel und dem periotischen Mesenchym getrieben (Rugh, 1990). Durch Otocysten-Transplantationsexperimente konnte gezeigt werden, daß das Mesenchym, möglicherweise über die Regulation von Zellbewegungen, die globale Organisation des Musters der Differenzierung und die Morphogenese des Innenohrs steuert (Swanson et al., 1990).

Welche Faktoren aus dem Hinterhirn oder periotischen Mesenchym im Innenohr aktive Gene steuern oder welche Moleküle bei der Ausbildung des Innenohres interagieren, ist nur in den Ansätzen untersucht.

Da die Funktion der einzelnen Gene innerhalb der Vertebraten hochkonserviert ist, werden zur Aufklärung entwicklungsbiologischer Prozesse je nach den zu untersuchenden Fragestellungen Maus-, Hühnchen- oder Zebrafischembryonen als Modellsystem verwendet. Die gezielte Inaktivierung von Genen durch homologe Rekombination („Knock-out“) wird in Mäusen durchgeführt (Bedell et al., 1997). Diese Methode erzeugt Mausmutanten, deren Phänotyp Aufschluß über die Funktion des inaktivierten Gens gibt. Allerdings sind Redundanzen durch koexprimierte, verwandte Gene möglich, so daß die Funktion des inaktivierten Gens nicht immer sichtbar erfaßt werden kann. Die Aktivität und die Regulationsmechanismen von Genen werden auch in *in vitro* kultivierten, embryonalen Geweben und Organen von Hühnchen oder Maus untersucht. In diesem System kann auf die Morphologie und die Genexpression in einem definierten Entwicklungsstadium Einfluß genommen werden. Damit können Erkenntnisse über die Funktion der untersuchten Faktoren in einem speziellen, zeitlich begrenzten Prozeß gewonnen werden (Chen et al., 1996; Kioussi

& Gruss, 1994; Leon et al., 1995; Qin & Kirby, 1995; Represa & Bernd, 1989; Srivasta et al., 1995; Varela-Nieto et al., 1991; Zheng et al., 1997).

Ein ebenfalls geeignetes Modellsystem, Genfunktionen zu untersuchen, stellen Expressionsanalysen in Mausmutanten dar. Über veränderte Genexpressionsmuster können Moleküle identifiziert werden, die an dem in der Mutante gestörten Prozeß beteiligt sind. Entsprechende Daten geben Hinweise auf funktionelle Zusammenhänge und mögliche Signalwege (Frohman et al., 1993; McKay et al., 1996; Zhang et al., 1994).

In erster Linie kommen zwei Klassen von Molekülen für den Steuerungsprozess der Innenohrmorphogenese in Frage. Zum einen Signalmoleküle, welche als diffundierbare Moleküle (Wachstumsfaktoren oder Morphogene) Signale zwischen verschiedenen Zellen und Geweben übermitteln und über die Bindung an einen Rezeptor, spezifische Signaltransduktionskaskaden in Gang setzen. Zum anderen Transkriptionsfaktoren, welche als DNA bindende Proteine, Gruppen spezifischer Zielgene an- oder abschalten.

Die größte Gruppe der interzellulären Signalmoleküle ist die *TGF- $\beta$*  (transforming growth factor) Superfamilie. Diese Moleküle sind in der Evolution hochkonserviert und regulieren embryonales Wachstum und Differenzierung (Wall & Hogan, 1994). Expressionsstudien zeigen, daß viele dieser Gene in embryonalen Geweben aktiv sind, welche induktive Interaktionen und Musterbildung unterlaufen (Hogan, 1996). *TGF- $\beta$* - Moleküle und eine Subgruppe der Superfamilie, die *BMPs* (Bone morphogenetic proteins), wurden auch im sich entwickelnden Innenohr nachgewiesen (Frenz et al., 1992; Oh et al., 1996; Wu & Oh, 1996). Für das Molekül *TGF- $\beta$ 1* konnte beispielsweise eine Funktion als verknöcherungsstimulierendes Signal für das den Ohrvesikel umgebende Mesenchym gezeigt werden (Frenz & Van De Water, 1991; Frenz et al., 1992). Mitglieder der Wachstumsfaktor-Familien *EGF* (epidermal growth factor), *FGF* (Fibroblast growth factor), *IGF* (insulin like growth factor) und *NGF* (nerve growth factor) konnten ebenfalls im sich entwickelnden Innenohr nachgewiesen werden. Diese Moleküle spielen eine bedeutende Rolle bei der Proliferation und/oder Differenzierung von Zellen (Bernd & Represa, 1989; Zheng et al., 1997). Bisher im Innenohr identifizierte Faktoren und deren Rezeptoren wurden daher immer auch in den Anlagen der Sinnesepithelien, zu deren Ausdifferenzierung verstärkt Zellen proliferieren, detektiert (Peters et al., 1993; Wilkinson et al., 1989; Wu & Oh, 1996; Yamashita & Oesterle, 1995; Zheng et al., 1997). Für den FGF Rezeptor-3 konnte durch die gezielte Inaktivierung des Gens in Mäusen dessen essentielle Rolle bei der Ausbildung spezialisierter Stützzellen im Hörsinnesorgan der Cochlea (Organ of Corti) gezeigt werden (Colvin et al., 1996).

Die Aktivität vieler Transkriptionsfaktoren, welche an die Regulatorsequenzen von Strukturgenen oder von ebenfalls für Transkriptionsfaktoren codierende Regulatorgene binden, ist von interzellulären Signalen, wie sie hier beispielhaft beschrieben wurden, abhängig. Von besonderem Interesse für die Aufklärung entwicklungsbiologischer Prozesse sind Transkriptionsfaktoren, welche durch Homeoboxgene codiert werden. Homeoboxgene sind in der Evolution hochkonserviert. Sie wurden erstmals in *Drosophila* identifiziert und



erfüllen in diesem, sich entwickelnden Organismus entscheidende Funktionen in organogenetischen Prozessen. Die homeotischen Gene unter ihnen bestimmen im Embryo insbesondere die Spezifität von Kompartimenten, deren Grenzen zuvor über Segementierungsgene festgelegt worden sind (Gehring, 1987; Kornberg & Tabata, 1993).

Bei der Maus wurden verschiedene Homeoboxgenfamilien identifiziert. Mitglieder dieser Genfamilien sind den Drosophila-Genen hinsichtlich ihrer Struktur und Funktion homolog (Holland, 1992). Die zum Drosophila-*HOM-C* Komplex homologen *Hox* Gene waren die ersten Maus-Homeoboxgene, die auf der Basis von Sequenzhomologien isoliert wurden (Akam, 1989; Hunt et al., 1991; Krumlauf, 1994). Diese Gene zeigen spezifische, räumlich-zeitliche Expressionsmuster und erfüllen entscheidende Funktionen bei der Spezifizierung und Determinierung der Embryonalachse (Lawrence & Morata, 1994; Lumsden & Krumlauf, 1996). Weitere Maus-Genfamilien, beispielsweise die zum Drosophila-*msh* Gen homologen *Msx* Gene (Davidson, 1995), die Drosophila-*NK* homologen *Nkx* Gene (Price et al., 1992; Bober et al., 1994) und die Drosophila-*pair ruled* homologen *Pax* Gene (Gruss & Walther, 1992), spielen ebenfalls eine essentielle Rolle bei der Organo- und Neurogenese.

Einige der in bekannte Homeobox-Genfamilien eingeordnete Gene sind auch im sich entwickelnden Innenohr aktiv, u. a. *Msx-1* und *Msx-2* (Suzuki et al., 1991), *Otx-1* (Simeone et al., 1993), *Pax-2* (Nornes et al., 1990), *Msal* (Ott et al., 1996), *soho-1* (Deitcher et al., 1994), *GH6* (Kiernan & Fekete, 1997), *Dlx-3* (Ekker et al., 1992), *Dlx-1*, *Dlx-5* und *Dlx-6* (Stein et al., 1996). Expressionsstudien zeigen, daß diese Gene im Otocysten größtenteils asymmetrisch exprimiert werden. Es ist anzunehmen, daß die DNA-bindenden, hochkonservierten Proteine regionale Identitäten in der Ohranlage und im Otocysten festlegen und hier an der Determinierung von Zellen beteiligt sind (Fekete, 1996; Kiernan & Fekete, 1997).

Für einige Transkriptionsfaktoren konnte bereits eine entscheidende Funktion für die Ausbildung spezifischer Innenohrstrukturen nachgewiesen werden: Die Mutation des Pou Gens *Brn-1* führt zu einem Verlust der Haarsinneszellen in den sensorischen Epithelien (Erkman, 1996), in *Pax-2* defizienten Mäusen ist die Cochlea nicht entwickelt (Torres et al., 1996) und in der *Otx-1* Mutante fehlt der laterale Bogengang (Acampora et al., 1996).

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit sollte die Expression und Funktion von Genen, die eine regulatorische Rolle bei der Morphogenese des Innenohres spielen könnten, untersucht werden. Der Schwerpunkt liegt hierbei auf der Untersuchung von *Nkx5-1* und *Nkx5-2*, zweier nahe verwandter, chromosomal gekoppelter („geclusterter“) Homeoboxgene, welche im sich entwickelnden Innenohr aktiv sind (Bober et al., 1994; Rinkwitz-Brandt et al., 1995). Diese Gene sind hochkonserviert (Martinez & Davidson, 1997; Stadler et al., 1995) und spielen vermutlich bei der Ausbildung spezialisierter Strukturen des Innenohres eine essentielle Rolle. Eine solche, entscheidende Funktion für die Ausbildung des vestibulären Teils des Innenohrs konnte jüngst durch ein „Knock-out“ Experiment für das *Nkx5-1* Gen aufgezeigt werden (Hadrys et al., 1998). Zwei weitere Gene, deren Expression zum gleichen Zeitpunkt im sich entwickelnden Innenohr nachgewiesen werden konnte, werden hier ebenfalls

untersucht. Es handelt sich um ein Tyrosinkinase-gekoppeltes Oberflächenrezeptorprotein, *sek* (Nieto et al., 1992), ein Molekül, das Wachstumsfaktoren bindet und den Transkriptionsfaktor *Pax-2* (Nornes et al., 1990), der, wie kürzlich herausgefunden wurde, eine Schlüsselfunktion bei der Ausbildung der Cochlea ausübt (Torres et al., 1996; siehe oben).

Für die genannten Gene sollte eine Expressionsanalyse durchgeführt werden, welche die Verteilung der Gentranskripte definierten Strukturen zuordnet. Im Rahmen dieser Analyse sollte eine genaue Kartierung der Genexpressionsmuster während der Innenohrentwicklung der Maus erbracht werden. Ausgehend von der normalen Verteilung der Gentranskripte sollten vergleichende Expressionsanalysen in verschiedenen Innenohrmutanten der Maus vorgenommen werden. Mausmutanten mit primären Innenohrdefekten und solche mit Innenohrdefekten, die auf Hinterhirnmißbildungen zurückzuführen sind, sollten untersucht werden. Die Analyse beider Gruppen sollte u. a. Hinweise auf mögliche autonome (innerhalb des Innenohres) oder externe (hier: hinterhirnabhängige) Signale liefern, die die Aktivität des *Nkx5-1* Gens beeinflussen.

In einem parallelen Ansatz sollte überprüft werden, ob die Expression ohrspezifischer Gene in einem *in vitro* Kultursystem nachgewiesen und modifiziert werden kann. Das Ziel war die Entwicklung eines *in vitro* Modells, welches einzelne Schritte der Innenohrmorphogenese mitsamt der Genexpressionsmuster nachstellt. Durch den Einsatz von Antisense-Oligonukleotiden sollte das *Pax-2* Gen *in vitro* inaktiviert werden und seine Funktion während der späteren Entwicklungsstadien untersucht werden. Da die Inaktivierung des *Pax-2* Gens in der Maus, in der Agenesie der Cochlea resultiert und somit die Aufklärung möglicher, späterer *Pax-2* Funktionen verhindert, sollte ein derartiges *in vitro* Modell alternativ zur Geninaktivierung in der Maus verwendet werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragmente 150 U (200µl)	Boehringer, Mannheim
Autoradiographie Emulsion Typ NTB-2	Kodak, Frankfurt am Main
BCIP	Boehringer, Mannheim
Bio-Gel A50	Bio-Rad, München
Cell Tak	Becton Dickinson, Heidelberg
Digoxigenin-11-UTP	Boehringer, Mannheim
DNA molecular weight marker II, λDNA Hind III	Boehringer, Mannheim
DNase (RNase frei)	Promega, Heidelberg
Einmalfilter Minisart NML (0.2 und 0.45 µm)	Sartorius, Göttingen
Falcon Organkulturschalen, 60 x 15 mm	Becton Dickinson, Heidelberg
Faltenfilter	Schleicher & Schüll, Hannover
Hefe-tRNA	Boehringer, Mannheim
Jetnick Probe Purification Kit	Genomed, Bad Oeynhausen
Kodak D-19, Entwickler	Kodak, Frankfurt am Main
NBT	Boehringer, Mannheim
Polycarbonatfilter 13mm Durchmesser	Millipore, Eschborn
Präparationswerkzeuge	Plano, Wetzlar
Quiagen Plasmid Maxi-Kit	Quiagen, Hilden
Rapid-fix	Kodak, Frankfurt am Main
Ribonucleode Triphosphate Set (ATP, CTP, GTP)	Boehringer, Mannheim
RNase A	Boehringer, Mannheim
RNase Inhibitor	Promega, Heidelberg
RNA-Polymerasen, Transkriptionspuffer	Promega, Heidelberg
Rotiszint 22	Roth GmbH, Hamburg
SDS	Bio-Rad, München
Tween-20	USB, Bad Homburg
Vectabond - Reagent	Camon, Wiesbaden

Soweit nicht anders erwähnt, wurden handelsübliche Chemikalien in Analysequalität und Biochemikalien der Firmen Merck (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) verwendet. Restriktionsenzyme wurden von New England Biolabs

(Schwalbach) bezogen. Radioaktive Substanzen stammten vom Amersham Buchler (Braunschweig). Verbrauchsmaterialien, die nicht gesondert aufgeführt sind, wurden von der Firma Wilke & Witzel (Hamburg) geliefert.

### **2.1.2 Stammlösungen, gepufferte Salzlösungen und Kulturmedien**

Lösungen für den routinemäßigen Gebrauch in der Molekularbiologie wurden nach Sambrook et al. (1989) angesetzt. Die benötigten Chemikalien wurden in bidestilliertem Wasser gelöst und nach Bedarf autoklaviert bzw. sterilfiltriert.

Für die Organkulturen verwandte Kulturmedien und gepufferte Salzlösungen wurden von der Firma Gibco BRL (Eggenstein) bezogen.

#### **2.1.2.1 Stammlösungen**

##### *LB-Medium*

10 g Trypton

5 g Hefeextrakt

10 g NaCl

1 Liter, pH 7.2, autoklavieren

##### *LB-Agar*

LB-Medium mit 15 g/l Agar

Dem LB-Medium bzw. LB-Agar wird, bei Verwendung als Selektivmedium, nach Abkühlung auf 55°C, Ampicillin bis zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben.

##### *L-Glutamin* (100 fache Stammlösung)

200 mM, bestellt bei Biochrom KG, seromed®, (Berlin)

#### **2.1.2.2 Gepufferte Salzlösungen**

##### *EDTA, 0.5 M, pH 7.6*

186 g EDTA in 800 ml bidestilliertem H<sub>2</sub>O lösen

mit 10 N NaOH bis zum Lösen auf pH 8.0 bringen

pH 7.6 mit Essigsäure einstellen

1 Liter

*PBS (10 x)*

105.6 g NaCl

2.64 g KCl

15.2 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

2.64 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

1 Liter, pH 7.4, steril filtrieren

*SSC (20 x)*

3 M NaCl

0.3 M tri-Natriumcitrat

mit NaOH auf pH 7.0 einstellen

*TBE (5x)*

445 mM Tris-HCl (pH 8.2)

445 mM Borsäure

10 mM EDTA

*TE-Puffer*

10 mM Tris-HCl (pH 8.0)

1 mM EDTA

*Tris/HCl. 1M, pH 7.5*

121.14 g Tris-Base

auf 800 ml mit bidestilliertem H<sub>2</sub>O auffüllen

pH 7.5 mit HCl einstellen

1 Liter

**2.1.3 Antibiotika**

Es wurden Stammlösungen der Antibiotika angesetzt, welche steril filtriert und bei -20°C gelagert wurden.

*Ampicillin -Stammlösung:* 50 mg/ml H<sub>2</sub>O

*Penicillin/Streptomycin* (100x-Konzentrat)

(10000 IE/10000 µg/ml), bestellt bei Biochrom KG, seromed®, (Berlin)

#### 2.1.4 Sterilisation von Lösungen und Geräten

Glaswaren wurden bei trockener Hitze bei 180°C sterilisiert oder bei 134°C bei einem Dampfdruck von 2.2 bar 20 min autoklaviert. Plastikwaren wurden bei 120°C und einem Druck von 1.1 bar für 30 min autoklaviert. Die Zeitangaben sind reine Sterilisationszeiten. Nicht hitzestabile Lösungen wurden durch Filtration durch Zelluloseacetatfilter mit einer Porengröße von 0.2µm sterilisiert.

#### 2.1.5 Bakterienstämme

Zur Transformation von Plasmid-DNA wurden E. coli-Zellen des Stammes *XL1-Blue* (supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac-; F-[proAB+ lacIq lacZdeltaM15 Tn10(tetr)]) eingesetzt (Bullock et al., 1987). Die Bakterien wurden von der Firma Stratagene (Heidelberg) bezogen.

#### 2.1.6 Die für *in situ* und *whole mount* Hybridisierungen verwendeten Proben

Die unten aufgeführten Konstrukte dienten als Matrize zur Herstellung von Antisense-Proben, welche zum Nachweis von Genexpression in embryonalen Geweben eingesetzt wurden. Die Schnittstellen, die das jeweilige Konstrukt linearisieren und die Synthese eines Transkripts mit definierter Länge ermöglichen, sind angegeben.

##### Maus *Nkx5-1* cDNA:

1970 bp der *Nkx5-1* cDNA wurden in pKS<sup>(+)</sup> in der EcoRI Schnittstelle subkloniert.

Antisense-Probe (900 bp): Linearisierung mit Pvu I, T3-RNA Polymerase

(Beschrieben in: Bober et al., 1994)

##### Maus *Nkx5-2* cDNA::

1480 bp der *Nkx5-2* cDNA wurden in pKS<sup>(+)</sup> in der EcoRI Schnittstelle subkloniert.

Antisense-Probe (550 bp): Linearisierung mit BamHI, T3-RNA Polymerase

(Beschrieben in: Rinkwitz-Brandt et al., 1995)

##### Maus *Pax-2*: cDNA:

Der Subklon pBS 31-A wurde von P. Gruss freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Das Konstrukt enthält ein 527 bp EcoRI - BamHI Fragment vom *Pax-2* Klon 31-A.

Antisense-Probe (527 bp): Linearisierung mit BamHI, T3-RNA Polymerase

(Beschrieben in: Dressler et al., 1990)

Maus *sek*: cDNA:

1.5 kb der 3'untranslatierten und C-terminalen codierenden Sequenzen wurden in pKS<sup>(+)</sup> in der EcoRI Schnittstelle subkloniert (von D. Wilkinson freundlicherweise zur Verfügung gestellt).

Antisense-Probe (410 bp): Linearisierung mit HindIII, T7-RNA Polymerase  
(Beschrieben in: Nieto et al., 1992)

Maus *Trp-2* cDNA:

Der *Trp-2* Klon p5A7 wurde von I. Jackson (Edinburgh) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Ein EcoRI-Fragment (1200 bp) der *Trp-2* cDNA wurde in pBS subkloniert.

Antisense-Probe (1200 bp): p5A7 linearisiert mit HindIII, T7-RNA Polymerase  
(Beschrieben in: Steel et al., 1992)

Maus *Msx-1* cDNA:

Der Klon pMT7T3-f<sub>1</sub> enthält ein 1200 bp Fragment der *Msx-1* cDNA, einkloniert in die SmaI Schnittstelle.

Antisense-RNA Probe (1200 bp): Linearisierung mit NotI, T3-RNA Polymerase.

Maus *FGFR-2* cDNA - Klon *bek-1*:

Der Klon *bek 1* (von Thomas Braun freundlicherweise zur Verfügung gestellt) enthält 281 bp aus dem 5'Bereich der *FGFR2* cDNA. Diese Region ist für die *bek* Rezeptorvariante spezifisch. Das Fragment ist in pKS<sup>(+)</sup>, in der SmaI Schnittstelle, subkloniert.

Antisense-Probe (280 bp): Linearisiert mit BamHI, T3-RNA Polymerase  
(Beschrieben in: Orr-Urtreger et al., 1991)

**2.1.7 Verwendete Oligonukleotide**

Antisense-Oligonukleotide zur *Pax-2* cDNA:

Phosphorothioat-substituierte 19-mer Oligodesoxynukleotide (Rothenpieler & Dressler, 1993)

AS14 (antisense)	5'- CAT CGG GAG GCA GAG GAG C -3'
S14 (sense)	5'- GCT CCT CTG CCT CCC GAT G -3'
	(309-327 bp vom Translationsstart entfernt)
SCR14 (as-scrambled)	5'- GCG AGG ACG GCG TAG AGA C -3'
AS17 (antisense)	5'- GGG AGG CCG TGC TGG GAA C -3'
S17 (sense)	5'- GTT CCC AGC ACG GCC TCC C -3'
	817-835 bp (zwischen Paired Domäne und Paired Octapeptid)
Fluorescein markiertes Oligonukleotid	5'- CGA GGA GAC <u>SGG</u> AGG GCT AC -3'

Bestellt bei Eurogentec (Deutschland, Köln)

### 2.1.8 Mäusstämme

*ICR* und *C57/Bl 6*

Diese Mäuse wurden von der Firma Harlan-Winkelmann (Paderborn) bezogen.

*fidget*

Die *fidget* Mutation wurde 1953 in *C57BL6* Mäuse eingekreuzt (Truslove, 1956).

Homozygote Männchen wurden vom Jackson Labor (Maine, USA) bezogen und mit *C57* Weibchen verkreuzt.

*spotch* - heterozygote Mäuse wurden von Prof. Thomas Franz (Bonn) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Tiere wurden in dieser Abteilung über mehrere Generationen in *C57/Bl 6* eingekreuzt.

## 2.2 Methoden

Reagenzien und Proben für die Vorbereitung enzymatischer Reaktionen wurden grundsätzlich auf Eis gekühlt. Enzymatische Reaktionen wurden mit den angebotenen Puffern nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen wurde standardmäßig nach dem Methodenbuch "Molecular Cloning" (Sambrook et al., 1989) durchgeführt.

### 2.2.1 Vervielfältigung und Präparation von Plasmid-DNA

DNA-Konstrukte wurden zu deren Vervielfältigung in *E. coli* Bakterien transformiert. Der Transfer von Plasmid-DNA in Bakterienzellen ermöglicht durch die Kultivierung des transformierten Bakterienklones die Reduplikation der in die Plasmidvektoren eingebrachten DNA-Fragmente. Die vervielfältigte Plasmid-DNA wird aus den Bakterien isoliert und gereinigt.

#### 2.2.1.1 Herstellung kompetenter Zellen nach der PEG-Methode

Transformationskompetente Zellen wurden nach einer von Nishimura und Mitarbeitern (1990) beschriebenen Methode hergestellt.

Aus einer 5 ml Übernachtskultur des *E.coli*-Stammes *XL-Blue* wurden 500 µl Zellsuspension entnommen, zum Animpfen in 50 ml Medium  $\Delta$  überführt und im Kulturschüttler bei 37°C



und 180 rpm solange inkubiert bis eine optische Dichte von 0.55 A<sub>578</sub>-E erreicht war. Daraufhin wurde die Kultur 10 min mit Eis gekühlt und zur Sedimentation der Zellen 10 min bei 1500 g und 4°C zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 500 µl eiskaltem Medium A resuspendiert, mit 2.5 ml Lösung B vorsichtig vermischt und in Aliquots zu 100 µl bei -80°C gelagert.

*Medium A:* 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.2% Glucose, in LB-Medium; Ansatz sterilfiltriert.

*Lösung B:* 36% Glycerin, 12% PEG 8.000, 12 mM MgSO<sub>4</sub>, in LB-Medium; Ansatz sterilfiltriert.

### 2.2.1.2 Transformation und Aufreinigung der Plasmid-DNA

Der als Transformation bezeichnete Vorgang besteht in der Einschleusung von Plasmid-DNA in zu diesem Zweck vorbehandelte Bakterienzellen. Transformatinskompetente Zellen besitzen eine in gewissem Maße durchlässige Zellwand.

Zur Transformation wurden 100 µl PEG-transformationskompetente Zellen auf Eis stehend aufgetaut. Zu den aufgetauten Zellen wurden 5 µl (10-100 ng) der Plasmid-DNA gegeben und der Ansatz für 15-30 min im Eis belassen. Im Folgenden wurden die Zellen für 1 min bei 42°C inkubiert, für 1-2 min wieder in das Eis gestellt und nach Zugabe von 1 ml LB-Medium eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Transformationsansätze wurden dann unter Zugabe von 40 µl IPTG (0.1 M in bidest.H<sub>2</sub>O) sowie 40 µl X-Gal (2% in Dimethylformamid) auf LB-Amp.-Agarplatten ausplattiert. Die Inkubation der Agarplatten erfolgte über Nacht bei 37°C. Zellen, welche das Plasmid beinhalten, weisen eine Ampicillinresistenz auf. Ampicillinresistente Klone wurden von einer LB-Agarplatte in 2 ml Schüttelkulturen überführt (Inkubation für ca. 6 h bei 37°C) und mit diesen Vorkulturen 50 - 100 ml Kulturen angeeimpft, welche über Nacht inkubierten (Kulturmedien siehe Punkt 2.1.2.1).

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus den Flüssigkulturen wurde mit einer QUIAGEN-tip 100 Säule nach dem Midi-Präparationsprotokoll durchgeführt. Die DNA wurde in Wasser aufgenommen und die Menge photometrisch bestimmt (Siehe Punkt 2.2.3).

### 2.2.2 Reinigung von DNA/RNA mittels Alkoholpräzipitation

#### Isopropanolpräzipitation

Zur Fällung der DNA aus den Restriktionsansätzen wurde 1 Volumen 4 M NH<sub>4</sub>Ac und im Anschluß ein 2 faches Gesamtvolumen Isopropanol zugegeben. Die Präzipitation erfolgte für 10 bis 15 min bei Raumtemperatur. Die ausgefällten Nukleinsäuren wurden durch eine 15 minütige Zentrifugation bei 14000 rpm (Eppendorf Tischzentrifuge) sedimentiert. Das

Überstand wurde dekantiert und das DNA-Sediment noch einmal in 70% Ethanol gewaschen. Nach erneuter 5 minütiger Zentrifugation wurde das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und in bis zu 50 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### Ethanolfällung

Zur Fällung von DNA/RNA mit Ethanol wurden der DNA- bzw. RNA-Lösung 0.1 Volumina 3 M Natriumacetat pH 5.2 und 2.5 Volumina vorgekühltes Ethanol p.a. zugesetzt. Daran schloß sich eine Inkubation für eine Stunde bei -80° C, bzw. über Nacht bei -20° C an. Die präzipitierte DNA wurde dann durch Zentrifugation für 30 min bei 4°C und 14000 rpm (Eppendorf-Tischzentrifuge) sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Sediment wurde mit vorgekühltem Ethanol (70 %) gewaschen und für weitere 5 min bei 4°C und 15000 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Sediment bei Raumtemperatur getrocknet und in TE-Puffer oder bidest. H<sub>2</sub>O resuspendiert.

### **2.2.3 Konzentrationsbestimmung von wässrigen Nukleinsäurelösungen**

Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit von wässrigen DNA- und RNA-Lösungen erfolgte durch Messung der Absorptionswerte bei den Wellenlängen 230, 260 und 280 nm. Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei 260 nm, das von Proteinen bei 280 nm und das von Salzen bei 230 nm. Die Berechnung der Konzentration erfolgte nach folgender Regel: 1 A<sub>260</sub> E entspricht 50 µg/ml DNA bzw. 40 µg/ml RNA bei einer Schichtdicke von 1 cm. Der Quotient A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> wurde zur Bestimmung der Reinheit der Nukleinsäurelösung herangezogen. Dieser Wert sollte für reine DNA bzw. RNA-Lösungen zwischen 1.8 und 2.0 liegen.

Oligonukleotidkonzentrationen (siehe Punkt 2.2.13.3) wurden unter Berücksichtigung der Größe der Nukleotide in nmol errechnet. Eine OD Einheit entspricht bei der Messung von Oligonukleotiden einer Masse von 30 - 35 µg/ml DNA. Diese ist für 10-mers Oligonukleotide mit einer Menge von 10 nmol, für 20-mers Oligonukleotide mit 5 nmol, für 50-mers Oligonukleotide mit 2 nmol und für 100-mers Oligonukleotide mit 1 nmol gleichzusetzen.

### **2.2.4 Horizontale Agarosegelelektrophorese**

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen diente der Überprüfung der restriktionsenzymatischen Spaltung und zur Bestimmung der ungefähren Konzentration von DNA-Lösungen.

Für die Auftrennung klonierter DNA wurde in der Regel ein 1%iges Agaroseflachbettgel verwendet (1 g Agarose/100 ml 1 x TBE- Puffer), dem Ethidiumbromid, ein Fluoreszenzfarbstoff, dessen flaches, mehrgliedriges Ringsystem zwischen benachbarten Basenpaaren interkaliert und so eine Sichtbarmachung der DNA unter UV-Licht ermöglicht, in einer Konzentration von 0.5 µg/ml Gel zugefügt wurde. Dazu wurde die Agarose in 1 x TBE durch Kochen gelöst und auf 60 °C abgekühlt. 20 ml der Agaroselösung wurden, nach Zugabe von 1 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml), in die vorgefertigten Gelträger überführt. Nach Erkalten des Gels wurde die Elektrophorese in einer mit 1 x Laufpuffer (TBE) gefüllten Gelkammer bei konstanter Voltzahl (15 Volt/cm) durchgeführt. Als Längenstandard wurde DNA des Phagen Lambda verwendet, welche mit dem Restriktionsenzym HindIII gespalten worden war.

Der Probe wurden vor dem Auftragen 1/10 Volumen Ladepuffer hinzugefügt. Dieser Puffer dient durch seinen Ficoll 400-Anteil dem Absinken der aufgetragenen Probe in die präformierte Geltasche und durch seinen Bromphenolblau-Anteil der Markierung der vordersten Front der laufenden Probe.

#### Lösungen:

*10xTBE-Puffer*

*Ladepuffer:* 25 % Ficoll 400, 0.25 % Bromphenolblau, 0.25 % Xylencyanol

*Ethidiumbromid:* 10 mg/ml

### **2.2.5 Herstellung der Matrizen für die Synthese von RNA-Sonden**

Das System der *in vitro* Transkription von RNA-Hybridisierungsproben verwendet RNA-Polymerasen der Bakteriophagen T3, T7 (E.coli) oder SP6 (Salmonella) in Gegenwart von Ribonukleotiden. Das DNA-Fragment von dem ein *in vitro* Transkript erstellt werden soll, muß zuvor in die multiple Klonierungsstelle des entsprechenden Vektors stromabwärts der spezifischen Phagenpromotoren kloniert werden. Vor dem Einsatz des rekombinanten Plasmids in der Transkriptionsreaktion wird dieses durch Restriktionsendonukleasenverdau an der Stelle gespalten, an der die Transkriptionsreaktion stoppen soll. Somit entstehen Transkripte definierter Größe.

Jeweils 50 µg der unter Punkt 2.1.6 aufgeführten cDNA Konstrukte wurden in einem Reaktionsansatz von 100 µl Gesamtvolumen enzymatisch gespalten. Die linearisierten Plasmide wurden durch Isopropanolpräzipitation vom Proteinanteil gereinigt und das Pellet in sterilem, bidestilliertem H<sub>2</sub>O bis zu einer Konzentration von 1 µg DNA/µl gelöst. Die Konzentration der DNA-Lösung wurde mittels der Agarosegelelektrophorese überprüft.

### 2.2.6 *In situ* Hybridisierung

Die *in situ* Hybridisierung ist im Labor von D. Wilkinson etabliert worden und ist eine spezielle Anwendung der Nukleinsäure-Hybridisierung, bei der die Hybridisierungsreaktion auf Gewebeschnitten stattfindet. Nach der Fixierung der Gewebeschnitte auf dem Objektträger (siehe Punkt 2.2.9) bilden die Zellen eine solide Matrix, an der die Reaktion stattfinden kann. Die in den Zellen befindliche RNA wird durch einen Abbau der Proteine einer Hybridisierungsreaktion zugänglich gemacht. Hybridisierungsreaktion ist hier eine Paarung der Basen einer mit radioaktiv markierten Nukleotiden synthetisierten Antisense-RNA mit den Basen der komplementären zellulären mRNA. Ziel ist es die räumliche Verteilung einer bestimmten mRNA, als Maß für die Expression eines klonierten Gens, im Gewebe nachzuweisen.

Für die unten beschriebene Prozedur wurden die Objektgläser in spezielle Träger einsortiert, welche durch die Lösungen geführt wurden.

#### 2.2.6.1 Herstellung der Hybridisierungsprobe

##### Transkription:

Die Matrize für die RNA-Synthese ist ein linearisiertes Plasmid (siehe Punkt 2.2.5).

6 ml [ $S^{35}$ ]-UTP (Lagerung bei  $-70^{\circ}\text{C}$ ) wurden im Eppendorf-Reaktionsgefäß vorgelegt (aliquotiert). Im Folgenden wurden

- 2  $\mu\text{l}$  Transkriptionspuffer (10 x)
- 2  $\mu\text{l}$  0.1M DTT
- 1  $\mu\text{l}$  Linearisiertes Plasmid (c = 1 mg/ml)
- jeweils 1.2  $\mu\text{l}$  der Nukleotide ATP, CTP, GTP (10mM)
- 2.9  $\mu\text{l}$  Aqua ad iniectable
- 1  $\mu\text{l}$  RNasin (40.000 U/ml)
- 1.5  $\mu\text{l}$  RNA-Polymerase (15.000 U/ml)

zugegeben und vermischt. Die RNA-Synthese erfolgte für 2 h bei  $37^{\circ}\text{C}$ . Im Anschluß wurden, für den Abbau der Matrize, 1  $\mu\text{l}$  DNase zugegeben und der Ansatz nochmals für 15 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Als Carrier für die synthetisierte RNA während der Aufreinigung dienen 3  $\mu\text{l}$  Hefe-tRNA (10mg/ml).

Die Reinigung der markierten RNA von Proteinen und freien Nukleotiden ist wahlweise nach folgenden zwei Methoden durchgeführt worden.

a. Reinigung der RNA über die G50-Säule:

Vor der Säulenreinigung wurden die Nukleotidstränge in alkalischer Lösung durch Zugabe von 50 µl Hydrolyselösung A für 30 - 60 min bei 60°C fragmentiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl Neutralisationslösung B gestoppt. Die Hydrolysereaktion richtete sich nach der Länge des synthetisierten RNA-Transkripts:

< 100 bp	keine Hydrolyse
100 - 200 bp	20 min
200 - 300 bp	45 min
> 600 bp	60 min

Während der Fragmentierung wurde die Matrix (Bio-Gel G50, in G50 Puffer 1:1 zum Schwellen gelöst) luftblasenfrei in eine Pasteurpipette, deren abgebrochene Spitze mit steriler Glaswolle ausgestopft war, gefüllt und anschließend in 5 ml G50 Puffer äquilibriert.

Vor dem Probenauftrag wurden nacheinander noch 1 ml G50 Puffer (10 mM DTT), 50 µl Hefe-tRNA (10 mg/ml) und 0.5 ml G50 Puffer (10 mM DTT) auf die Säule gegeben. Um den Lauf der Probe verfolgen zu können, wurden ihr 3 µl Bromphenolblau zugegeben. Die Probe wurde mit DTT-haltigem (10 mM) G50 Puffer von der Säule gewaschen und Fraktionen von 500 µl (1. Fraktion) und 400 µl (alle weiteren Fraktionen) aufgefangen. Die radioaktiven Fraktionen (Identifizierung mit einem Geigerzähler) wurden durch Zugabe von 1/10 Vol 3 M KAc und 3 x Vol EtOH gefällt. Das getrocknete Pellet wurde in 10 µl 0.1 M DTT und 90 µl Hybridisierungspuffer gelöst.

b. Reinigung der RNA mittels des JETNICK "Probe Purification Kit"

Der Kit kann dazu genutzt werden DNA oder RNA aus einer Lösung in reiner Form zu isolieren.

Inhalt:

Jetnick-Suspension, Puffer B1 (EDTA, Tris/HCL), Puffer B2 (konz. NaClO<sub>4</sub>, EDTA, Tris/HCL), Puffer B3 (EtOH, NaCl, EDTA, Tris /HCl)

Die folgenden Schritte wurden gemäß dem Protokoll durchgeführt:

1. RNA-Bindung (in Puffer B1 und B2, Jetnick-Suspension)
2. Waschen mit hohem Salzgehalt (Puffer B2)
3. Waschen mit niedrigem Salzgehalt (Puffer B3)
4. Trocknen
5. RNA-Elution:

Das trockene Sediment wurde in 10 µl 0.1 M DTT und 90 µl Hybridisierungspuffer gelöst. Nach einer vollständigen Resuspendierung wurde die Lösung für 5 min in einem Wasserbad bei 50°C inkubiert, anzentrifugiert und der Überstand vorsichtig in einen Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben (= Hybridisierungsprobe).

Radioaktivität als Maß für die Markierung der RNA mit [ $S^{35}$ ]-UTP:

Die Radioaktivitätsmessungen der mit [ $S^{35}$ ]-markierten Hybridisierungsproben wurden in einem  $\beta$ -Szintillationszähler (Beckmann) durchgeführt. 1 µl der Proben wurden hierzu in ein Zählröhrchen mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint 22) gegeben. Durch Messung der Cerenkow-Strahlung im Tritiumkanal kann die Radioaktivität pro µl Probe in cpm (counts per minute) ermittelt werden.

Die gemessene Radioaktivität sollte einen Wert zwischen 50.000 - 80.000 cpm/µl haben, war dieser Wert größer, wurden die Proben entsprechend verdünnt.

Lösungen:

*Hydrolyselösung A*

10 µl 1 M DTT, 80 µl 1 M NaHCO<sub>3</sub>, 120 µl 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 790 µl H<sub>2</sub>O

*Neutralisierungslösung B*

200 µl 1 M Na Ac, 10 µl Essigsäure, 10 µl 1 M DTT, 780 µl H<sub>2</sub>O

*G50 Puffer*

10 mM Tris/HCl, 5 mM EDTA, 0.1% SDS

DTT (10 mM) kurz vor Gebrauch zusetzen (1 molare Stammlösung).

*Hybridisierungspuffer*

für 15 ml: 7.5 ml Formamid (100%), 1.125 ml 4 M NaCl, 300 µl 1 M Tris/HCl (pH 7.5), 150 µl 5 mM EDTA (pH 7.6), 150 µl 1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O (pH 8.0), 3 ml 50% Dextransulfat, 300 µl 50 x Denhardts, 0.75 ml Hefe-tRNA (10 mg/ml).

*Denhardts*

100 mg Ficoll, 100 mg Polyvinylpyrrolidon, 100 mg Rinderserumalbumin, 100 ml steriles H<sub>2</sub>O

## 2.2.6.2 Hybridisierungsprotokoll

1. Prähybridisierung:

Die Gewebeschnitte wurden entparaffiniert und hydratisiert, um anschließend durch einen Abbau der Proteine und verschiedene Fixierungs- und Waschschrte für die Hybridisierung vorbereitet zu werden. Die einzelnen Schritte sind tabellarisch zusammengefaßt:

Häufigkeit	Lösung	Inkubationszeit
2 x	Xylol	10 min
1 x	EtOH (100%)	2 min
1 x	EtOH (100, 95, 85, 70, 50, 30%)	jeweils 20 sec
1 x	0.85 NaCl	5 min
1 x	PBS	5 min
1 x	4% Paraf./PBS	20 min
2 x	PBS	5 min
1 x	Proteinase K	7.5 min
1 x	PBS	5 min
1 x	4% Paraf./PBS	5 min
1 x	H <sub>2</sub> O	1 min
1 x	Triethanolamin (Magnetrührer, 625 µl Essigsäureanhydrid über die Schnitte geben)	10 min
1 x	PBS	5 min
1 x	0.85 NaCl	5 min
1 x	EtOH (30, 50, 70, 85, 95, 100, 100%)	jeweils 20 sec

Anschließend wurden die Gewebeschnitte bei Raumtemperatur getrocknet (mindestens 30 min) und innerhalb von 3 Tagen hybridisiert.

## 2. Hybridisierung und abschließende Waschgänge:

Die Hybridisierung erfolgte in einer Plastikkammer, in welche zur Luftbefeuchtung ein in Formamidlösung getränktes Zellstofftuch gelegt wurde. Die Kammer wurde luftdicht verschlossen und für 16 Stunden bei 52°C in einen Inkubations- bzw. Trockenschrank gestellt.

Pro Gewebeschnitt wurden ca. 15 µl Probe, welche zuvor für 2 min auf 80°C erhitzt und dann 1 min auf Eis gestellt wurde, eingesetzt. Deckgläschen, in 100% EtOH gereinigt und anschließend getrocknet, wurden auf die Schnitte gelegt, damit diese nicht austrocknen.

Nach der Hybridisierung wurden die im folgenden aufgeführten Waschgänge und die Spaltung der nicht-hybridisierten, somit einzelsträngigen RNA durchgeführt.

Häufigkeit	Lösung	Temperatur	Inkubationszeit
1 x	5 x SSC, 10 mM DTT	50°C	30 min
1 x	50% Formamid, 2 x SSC, 10 mM DTT	65°C	20 min
2 x	Waschlösung	37°C	10 min
1 x	RNase-Lösung	37°C	30 min
1 x	Waschlösung	37°C	5 min
1 x	2 x SSC	37°C	15 min
1 x	0.1 x SSC	37°C	15 min
1 x	EtOH (30, 60, 80, 95,	RT	jeweils 30 sec
			100%)

Die Gewebeschnitte trockneten nach der Dehydratisierung für mindestens eine halbe Stunde bei Raumtemperatur.

Lösungen:

*4% Paraformaldehyd/PBS*: 10 g Paraformaldehyd werden in 200 ml bidest. H<sub>2</sub>O unter Zugabe von 15 µl 10 N NaOH gelöst (Magnetrührer, 65°C), Lösung filtern (Faltenfilter), Zugabe von 25 ml PBS (10 x), auf 250 ml mit H<sub>2</sub>O auffüllen und auf Eis stellen.

*Proteinase K*: Stammlösung: 20 mg Proteinase K in 1 ml H<sub>2</sub>O, bei -20°C gelagert

*PK-Puffer*: für 200 ml: 10 ml 1 M Tris/HCl, 2 ml 0.5 M EDTA

*0.1 M Triethanolamin*: für 250 ml: 3 ml Triethanolamin

*Waschlösung (10 x)*: für 1 Liter: 233.8 g NaCl, 100 ml 1 M Tris (pH 7.5), 100 ml 0.5 M EDTA)

*RNase-Lösung (20 µg/ml)*: Stammlösung: 10 mg/ml - hiervon 20 µl auf 100 ml Waschlösung (1 x)

*Formamidlösung*: 10 ml Formamid, 4 ml 20 x SSC, 6 ml H<sub>2</sub>O

### 2.2.6.3 Autoradiographie

Die Objektträger mit den dehydratisierten Schnitten wurden unter Lichtausschluß in eine 45°C warme Photoemulsion (Kodak NTB-2) möglichst Luftblasen frei eingetaucht. Nach 2 h Trocknungszeit wurden sie in einer Plastikkammer lichtdicht verpackt und bei 4°C für 7 Tage exponiert.

Vor der Entwicklung wurden die Schnitte auf Raumtemperatur erwärmt.

Entwicklungsprozedur:

3.5 min Kodak D-19 bei 16°C (Entwickler, 40 g in 250 ml bei 65°C gelöst)

Kurzes Eintauchen in H<sub>2</sub>O

2 min Rapid-fix (Fixierer 1:5 verdünnt)

10 kurze Spülgänge in H<sub>2</sub>O

Nach diesen Schritten konnten die Schnitte ans Licht gebracht werden. Die Photoemulsion wurde von der Rückseite des Objektträgers abgezogen und die Schnitte in 0.2%iger Toluidinblau Lösung für 40 sec gefärbt. Die Schnitte wurden dann in anschließenden H<sub>2</sub>O-Bädern gewaschen und ein eventueller Farbüberschuß durch 0.01 N HCL entfernt. Nach der Dehydratisierung in einer aufsteigenden Ethanolreihe (50, 70, 85, 95, 2 x 100%) und zwei Xylol-Bädern (jeweils 2 min) wurden die Schnitte in einem Schnelleindeckmittel (Entellan) eingedeckelt.



#### 2.2.6.4 Mikroskopie/Fotografie

Die Photoemulsion zeigt über allen Zellen, in denen radioaktiv markierte RNA hybridisiert hat, Schwärzungen, welche als Lichtpunkte im lichtmikroskopischen Dunkelfeld sichtbar werden. Im Hellfeld können die gefärbten Zellen betrachtet werden.

Die hybridisierten Gewebeschnitte wurden mit einem Kameraaufsatz (Zeiss) auf einem Schwarzweißfilm (Ilford Pan F, 50 ASA) abgeleuchtet. Für größere Bildausschnitte, welche bei einer 50-fachen oder 25-fachen Vergrößerung mikroskopiert wurden, wurde für die Dunkelfeldaufnahmen eine zusätzliche, äußere Beleuchtungseinrichtung verwendet (Kaltlichtquelle, Schott), wobei der Strahlengang im Mikroskop abgeschaltet war.

Zur Entwicklung der Negative wurde ein Entwicklungsgerät vom Typ AutoLab 1000 (Firma JOBO, SW-Entwickler: Ultrafin, SW-Fixierer: Superfix, Tetenal) eingesetzt. Die Negative wurden auf Fotopapier der Härte 3 (Ilfospeed, Ilford) abgeleuchtet (Belichtungsapparat: Leica V35, Focomat) und die Abzüge mit Chemikalien von Tetenal (Eukobrom, Superfix) entwickelt. Zusammengestellte Fototafeln wurden von einem Profi-Fotolabor als Repro-Negative abgeleuchtet. Abzüge hiervon wurden selbst hergestellt. Alternativ wurden die Negative in den Computer eingescannt (Nikon control) und hier Schwarzweiß-Fototafeln erstellt, welche mit einem Thermosublimationsdrucker (Sony, Digital Color Printer, UP-D8800) ausgedruckt wurden.

#### 2.2.7 Whole mount in situ Hybridisierung

Die hier angewandte Methode ist im Labor von David Wilkinson für die Hybridisierung von ungeschnittenen Embryonen entwickelt worden. Die *whole mount* Methode beruht auf der Hybridisierung einer Digoxigenin-markierten Antisense-RNA-Probe mit endogener mRNA. Die RNA-Hybride können mit einem Phosphatase-gekoppelten Antikörper gegen Digoxigenin visualisiert werden.

Bis zum E11.5 ist eine *in situ* Hybridisierung von ganzen Embryonen ohne weiteres möglich. Zu einem späteren Entwicklungszeitpunkt empfiehlt es sich aufgrund der schwereren Erreichbarkeit der Gewebe durch die Probe, die zu analysierenden Embryonen zunächst zu schneiden. Die Embryonen wurden, wie unter Punkt 2.2.11 beschrieben, in PBS präpariert und über Nacht bei 4°C in 4% Paraformaldehyd fixiert. Zur Inhibition endogener Phosphatasen wurden die Embryonen nach deren Fixierung und zwei anschließenden Waschgängen in PBT schrittweise in 100% Methanol überführt (PBT/Methanol Reihe: 25%, 50%, 75%, 2 X 100% - jeweils 5-7 min). In dem Methanol wurden die Embryonen bei -20°C bis zur Analyse gelagert.

### 2.2.7.1 Herstellung der Hybridisierungsprobe

Für die Herstellung der Digoxigenin-markierten Probe wurden 1 mg des mit einem geeigneten Restriktionsenzym linearisierten Plasmids als Matrize eingesetzt (siehe Punkt 2.1.6 und 2.2.5). Die Probe wurde mit einer entsprechenden RNA-Polymerase in der Gegenwart von DIG-markierten Ribonukleotiden synthetisiert. Die Reagenzien wurden nach dem folgenden Schema bei Raumtemperatur vermischt:

- Aqua dest.	13 µl
- 0.2 M DTT	1 µl
- 10 x Transkriptionspuffer (400 mM TrisHCl, pH 8.25; 60 mM MgCl <sub>2</sub> ; 20 mM Spermidin)	2 µl
- Ribonukleotid-Mix (pH8,0) (10 mM GTP, 10 mM ATP, 10 mM CTP, 6.5 mM UTP, 3.5 mM Digoxigenin-UTP)	2 µl
- Linearisiertes Plasmid (1mg/ml)	1 µg
- RNase-Inhibitor	50 U
- RNA-Polymerase	10 U

Dabei wurde darauf geachtet, die DNA zuletzt zu dem Gemisch hinzuzugeben, um deren Präzipitation mit dem im Transkriptionspuffer enthaltenen Spermidin zu vermeiden. Das Gemisch wurde zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Zur Überprüfung der Effizienz der Synthese wurde ein zwanzigstel des Ansatzes auf einem Agarosegel analysiert. Nach der Synthese der Probe schloß sich ein 15 minütiger Abbau des Plasmids mit 2 µl DNase I bei 37°C an. Die Probe wurde mit TE auf 120 µl verdünnt und im 3-fachen Volumen Ethanol unter Zugabe von 10 µl 4M LiCl für 30 min bei -20°C präzipitiert. Nach einer 10 minütigen Zentrifugation, einem Waschschrift in 70% Ethanol und dem Lösen des Sediments in H<sub>2</sub>O, wurde die Probe bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Die Menge an zugegebenen H<sub>2</sub>O war abhängig von der Effizienz der RNA-Synthese, die Konzentration der Probe sollte 0.1 µg/µl betragen. Für die Hybridisierung wurden 10 µl der Probe pro ml Hybridisierungslösung eingesetzt.

### 2.2.7.2 Hybridisierung der Embryonen

Die im folgenden beschriebenen Reaktionsschritte wurden in 6er well - Schalen (Nunc, Greiner) durchgeführt, welche in Wasserbädern temperiert wurden.

Vor der Hybridisierung wurden die in Methanol gehaltenen Embryonen schrittweise rehydriert. Es folgte eine einstündige Inhibition endogener Peroxidasen in 6%

Wasserstoffperoxid und ein dreimaliges Waschen in PBT. Um eine bessere Durchdringlichkeit der Probe zu gewährleisten, schloß sich ein 15 minütiger Proteinabbau in 10 µg/ml Proteinase K an. Nach zweimaligem Waschen in 2 mg/ml Glycin erfolgte eine erneute Fixierung in 0.2% Glutaraldehyd und 4% Paraformaldehyd. Nach dieser Vorbehandlung der Embryonen schloß sich die Prähybridisierung bei 70°C an. Nach einer einstündigen Prähybridisierung erfolgte die eigentliche Hybridisierung bei 70°C mit 1 µg der markierten Probe/ml Hybridisierungslösung über Nacht.

An die Hybridisierung schlossen sich verschiedene Waschschrte an, die hier chronologisch unter Angabe von Waschzeit und -temperatur aufgeführt werden:

<i>Lösung</i>	<i>Zeit [min]</i>	<i>Temperatur [°C]</i>
2 x Lösg. 1	30	70
1 x Lösg. 1/2 (1:1)	10	70
3 x Lösg. 2	5	RT
2 x Rnase A	30	37
in Lösung 2 (f.c. 100 µg/µl)		
1 x Lösg. 2	5	RT
1 x Lösg. 3	5	RT
2 x Lösg. 3	30	65
3 x TBST	5	RT

Nach den Waschschrten, vor der Inkubation mit dem Phosphatase gekoppelten Antikörper, erfolgte die Absättigung gewebeeigener Antigene in 10% Schafserum/TBST für 60-90 min. Das Schafserum wurde kurz vor der Verwendung 30 min lang bei 70°C inaktiviert.

Während dieses Absättigungsschrittes wurde der Antikörper vorbereitet. Die Abblockung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte durch Inkubation mit Maus-Embryopulver, das aus 12.5-14.5 tägigen Embryonen, in Aceton homogenisiert, getrocknet und zerkleinert, gewonnen wurde. Für 2 ml Antikörper-Lösung wurden 3 mg Embryopulver mit 0.5 ml TBST für 30 min auf 70°C erhitzt und anschließend eine Stunde bei 4°C unter kontinuierlichem Schütteln zusammen mit 1 µl Digoxigenin-Antikörper (Fab-Fragmente; Boehringer Mannheim) inkubiert. Nach 10 minütiger Zentrifugation wurde der den abgeblockten Antikörper enthaltende Überstand abgenommen und mit 1%igem Schafserum in TBST auf ein Volumen von 2 ml aufgefüllt. Die Inkubation mit dem Antikörper erfolgte danach bei 4°C über Nacht.

#### Lösungen:

PBT: PBS, 0.1% Tween-20

Prähybridisierungslösung 50% Formamid; 5xSSC pH 4.5 (eingestellt mit Zitronensäure); 50 µg/ml Hefe-tRNA; 1% SDS; 50 µg/ml Heparin.

Hybridisierungs-Mix: Prähybridisierungslösung inklusive 1 µg/ml Hybridisierungsprobe

Lösung 1: 50% Formamid; 5xSSC; pH 4.5; 1% SDS

Lösung 2: 0.5M NaCl; 10 mM Tris/HCl pH 7.5; 0.1% Tween-20.

Lösung 3: 50% Formamid; 2xSSC pH 4,5.

10xTBST (100ml): 8 g NaCl; 0.2 g KCl; 25 ml 1M Tris/HCl pH 7.5; 10 ml 10% Tween-20.

Kurz vor der Verwendung wurden, zur Inhibition endogener Phosphatasen, 0.028 g/50 ml Levamisol zugesetzt.

### 2.2.7.3 Abschließende Waschschrirte und Histochemie

Alle folgenden Wasch- und Inkubationsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

<i>Lösung</i>	<i>Zeit [min]</i>
3 x TBST	5
5 x TBST	60
3 x NTMT	10

Es zeigte sich, daß eine Verlängerung der Spülzeiten und ein möglichst großes Volumen (bis zu 15 ml) an TBST unspezifischen Farbsignalen entgegenwirkte. An die Waschschrirte schloß sich die Alkalische Phosphatase-Farbreaktion mit 4.5 µl NBT/ml und 3.5 µl BCIP (X-Phosphat)/ml in NTMT an. Die Färbung erfolgte unter Lichtausschluß, bei Raumtemperatur und mäßiger Bewegung. Nach 2-3 Stunden war die spezifische Farbreaktion gewöhnlich beendet. Die Reaktion wurde daraufhin durch mehrmaliges Waschen in PBT (inkl. 5 mM EDTA) beendet.

#### Lösungen:

NTMT: 100 mM NaCl; 100 mM Tris/HCl pH 9.5; 50 mM MgCl<sub>2</sub>; 0.1% Tween-20.

Kurz vor der Verwendung wurden 0.028 g/50 ml Levamisol zugesetzt.

### 2.2.7.4 Mikroskopie/Fotografie

Die hybridisierten Embryonen wurden unter einem Stereomikroskop (Leica, Wild M 10) mikroskopiert. Diese Mikroskopie läßt eine dreidimensionale Betrachtungsweise zu. Mit einem Kameraaufsatz (Leica MPS) wurden die gefärbten Gewebe in unterschiedlicher Lage und mit verschiedenen Belichtungszeiten fotografiert (Kunstlichtfilm, Ektachrome - Kodak 64T). Zur detaillierteren Analyse wurden die Gewebe in Gelatine eingebettet und mit einem Vibratom 30 - 50 µm stark geschnitten (siehe Punkt 2.2.7). Die Schnitte wurden an einem Leica Mikroskop (Leitz DM RBE) mittels eines Kameraaufsatzes (Leica, Wild MPS) auf einem Kunstlichtfilm abgeleitet

Die Filmentwicklung erfolgte in einem Entwicklungsgerät vom Typ AutoLab (Firma JOBO; Chemikalien: Tetenal, E-6 3-Bad). Fotos wurden als Abzüge von dem Diafilm in einem Fotostudio gemacht. Teilweise wurden die Dias in den Computer eingescannt (Nikon) und unter Anwendung des Programmes "Adobe Photoshop" weiterbearbeitet. Die erstellten Fototafeln wurden mit dem Thermosublimationsdrucker (Sony, Digital Color Printer, UP-D8800) ausgedruckt.

### 2.2.8 Vibratomschnitte

Vibratomschnitte wurden wie bei Bober et al. (1994) beschrieben, durchgeführt. Dazu wurden zu schneidende Embryonen in Gelatine/Albumin - Blöcken eingebettet und mit dem Vibratom (VT 1000 E; Leica) in einer Schichtdicke von 30 und 100  $\mu\text{m}$  geschnitten.

#### Gelatine/Albumin - Mixtur:

0.049 g Gelatine wurden in 100 ml PBS unter Erhitzen gelöst. Die Gelatine wurde abgekühlt, 30 g Hühnereiweiß (Sigma) zugefügt und gerührt bis das meiste Eiweiß gelöst war. Es wurden 20 g Saccharose zugefügt, gelöst und die Mischung in kleinen Mengen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  weggefroren.

#### Einbettungsprozedur:

Es wurden flexible Formen mit Einbettungsmulden von ca. 0.6 x 1.2 cm Größe verwendet. Pro einzubettenden Embryo wurden 200  $\mu\text{l}$  der Gelatine in einer Mulde vorgelegt. 20  $\mu\text{l}$  25%iges Glutaraldehyd wurden dazugegeben, vermischt und der in Gelatine vorgebadete Embryo darin plziert. Bevor die Mischung aushärtet, wurden noch einmal 200  $\mu\text{l}$  Gelatine mit 20  $\mu\text{l}$  Glutaraldehyd vermischt und auf den Embryo gegeben. Die erhärteten Blöcke wurden aus der Form gedrückt und konnten bis zum Schneiden einige Tage in Kunststoffolie oder PBS bei  $4^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt werden.

### 2.2.9 Paraffinschnitte

Die Einbettung von Gewebestücken in Paraffinblöcken ermöglicht es, dünne Schnitte im Bereich von 4-15  $\mu\text{m}$  mit einem Mikrotom anzufertigen. Diese Schnitte sind genaueren Analysen, wie *in situ* Hybridisierungen, Antikörperfärbungen oder klassischen Färbemethoden gut zugänglich.

#### Beschichtung von Objektträgern

Um den Gewebeschnitten auf den Objektträgern eine Anheftungsmöglichkeit zu geben, wurden die Gläser in einer Lösung aus 7ml Vectabond-Reagent und 343 ml Aceton vorbehandelt

Die Objektträger wurden in entsprechenden Haltern zunächst in Aceton gereinigt und kurz getrocknet. Im Anschluß wurden sie für 5 Minuten in das oben beschriebene Reagenz überführt und dreimal für 30 Sekunden in destilliertem H<sub>2</sub>O gespült. Die Gläser trockneten über Nacht bei Raumtemperatur unter dem Abzug oder bei 37°C in einem Inkubations- oder Trocknungsschrank.

#### Waschen und Dehydratisierung der Gewebe

Embryonen und Innenohren wurden, wie unter Punkt 2.2.11 und 2.2.12 beschrieben, in PBS präpariert und über Nacht bei 4°C in 4%iger Paraformaldehyd/PBS Lösung (siehe Punkt 2.2.6.2) fixiert. In zwei anschließenden 30 minütigen Waschgängen in PBS bei 4°C wurde das Paraformaldehyd entfernt. Zur Behandlung von Geweben, welche *in situ* hybridisiert werden sollten, wurde der zweite Waschgang in 0.85% NaCl durchgeführt. Die Dehydratisierung der Gewebe erfolgte in einer aufsteigenden Ethanolreihe in destilliertem H<sub>2</sub>O: 50% (für die *in situ* Hybridisierung wurde hier der Wasseranteil durch 0.85%iges NaCl ersetzt), 2 x 70%, 85%, 95%, 2 x 100% - jeweils 30 min, in 70% EtOH 15 min -. Zur Entfernung des Ethanols aus dem Gewebe wurden zwei 30 minütige Schritte in Xylol durchgeführt. Die Überführung der Gewebe in das Paraffin fand bei 60°C im Trockenschrank über einen Zwischenschritt (45 min 50% Xylol/Paraffin) statt. Hierfür wurde das Paraffin zuvor geschmolzen und das Xylol und die Gefäße vorgewärmt. Das erste Paraffinbad wurde bereits nach einer Stunde gewechselt, das zweite wirkte über Nacht ein und das dritte mehrere Stunden. Es hat sich gezeigt, daß ein langes Waschen in Paraffin den Hintergrund bei der *in situ* Hybridisierung reduziert.

Für die Einbettung kleinerer Gewebe, wie die *in vitro* kultivierten Sinnesepithelien, welche auf Polycarbonatfiltern durch die Lösungen geführt wurden, wurden die einzelnen Schritte des Einbettungsverfahrens auf 5 min verkürzt, lediglich das Paraffin wirkte mehrere Stunden ein.

#### Einbetten und Schneiden

Die Gewebe wurden unter Verwendung eines Heizblockes in Metallformen eingebettet. Nach entsprechender Ausrichtung des Gewebes wurden die Formen auf Eis gestellt. Die Paraffinblöcke, aus der Form gedrückt, lagerten bis zur vollständigen Aushärtung für eine Nacht bei Raumtemperatur und dann bis zum Schneiden bei 4°C.

Die Anheftung der Gewebeschnitten an die beschichteten Objektträger erfolgte durch eine halbstündige Inkubation bei 56°C.

### 2.2.10 Hämatoxylin/Eosin-Färbung

Die Färbung von Paraffin-Gewebeschnitten wurde nach einem Protokoll von Bancroft and Stevens (1990) durchgeführt.

Arbeitsschritte:

- Deparaffinierung in Xylol 10 min
- Dehydratisierung in einer absteigenden Ethanolreihe 30 sec jeweils  
(2 x 100%, 95%, 85%, 70%, 50%, 30%)
- Waschen in H<sub>2</sub>O 30 sec
- Färben in Hämalaun (nach MAYER) 10 min
- Abspülen in H<sub>2</sub>O
- Differenzieren in HCl-Alkohol (1% HCl in 70% EtOH)
- Abspülen in H<sub>2</sub>O
- Bläuen in H<sub>2</sub>O 10 min
- Färben in 1%iger alkalischer Eosin-Lösung 30 sec  
(1% in 70% EtOH + einige Tropfen Eisessig)
- Differenzieren in 70% EtOH
- Dehydratisieren in aufsteigender Alkoholreihe
- Aufhellen in Xylol 5 min
- Eindeckeln mit einem Schnelleindeckmittel (Entellan)

### 2.2.11 Entnahme von Embryonen

Die Trächtigkeitsperiode wurde durch die Vaginal-Plug Methode bestimmt. Das Datum, an dem ein mucoider Plug in der Vagina der Maus beobachtet wurde, wurde als Embryonalentwicklungstag 0.5 bezeichnet und hiervon ausgehend der Termin für die Entnahme der Embryonen errechnet. Die trächtige, weibliche Maus wurde durch cervikale Dislokation getötet. Anschließend wurde die Bauchdecke des Tieres durch einen medianen Schnitt geöffnet und die zwei Uteri entfernt.

Embryonen, welche für Hybridisierungen verwendet wurden, wurden in PBS aus den Uteri herauspräpariert und im Anschluß zur Fixierung in eine 4%ige Paraformaldehyd/PBS-Lösung überführt.

Stellten die Embryonen das *in vitro* Kulturmaterial, wurden die trächtigen Uteri in vorgewärmtes (37.5°C) Kulturmedium (N&T serumfreies Medium) überführt und die Embryonen für die Innenohrpräparationen einzeln entnommen.

### 2.2.12 Präparation der Innenohrepithelien

Die Präparation der Innenohren aus Embryonen der Fetalperiode und aus Neugeborenen zur Einbettung in Paraffin erfolgte in PBS, noch vor der Fixierung der Embryonen. Die Köpfe wurden durch einen transversalen Schnitt unterhalb der occipitalen Knochen abgetrennt und die Innenohren bei jungen Embryonen über das äußere Ohr und bei älteren (ab E17.5), nach einem medialen Schnitt zwischen den parietalen Schädelknochen von der Innenseite des Schädels ausgehend, freipräpariert. Die Innenohren wurden im Anschluß für die Einbettung in Paraffin über Nacht fixiert.

Innenohrepithelien, welche *in vitro* kultiviert wurden, stammten aus Embryonen der Stadien E12.5 - E14.5. Die Embryonen wurden, vom Uterus umgeben, einzeln in vorgewärmte Hank's Salzlösung überführt und hier freipräpariert. Von der Kopfaußenseite ausgehend wurden die dem Hinterhirn beiderseits benachbarten Ohrregionen aus dem Kopf herauspräpariert und die Gewebe in kleinere Kulturschalen überführt. Hier wurden durch Entfernung des Oberflächenektoderms und des Kopfmesenchyms die Otocysten mitsamt dem periotischen Mesenchym isoliert.

In Embryonen des Stadiums E14.5 grenzt sich das entwickelnde Innenohr durch die Formierung des knöchernen Labyrinthes aus dem periotischen Mesenchym stärker vom umgebenden Gewebe ab. Die Strukturen des Innenohrs sind deutlich erkennbar. Aus Innenohren dieses Entwicklungsstadiums wurden zwecks *in vitro* Kultivierung die Cristae ampullaris freipräpariert. Hierzu wurden die Ampullen vollständig isoliert und deren Dächer geöffnet.

Die aus den Embryonen herauspräparierten Innenohrepithelien wurden zunächst im Organkulturmedium gesammelt und bis zur Überführung auf die Filtermembranen in den Organkulturschalen bei 37.5°C aufbewahrt.

### 2.2.13 Das Organkultursystem

Die Bedingungen für die Kultivierung der Innenohrepithelien wurden hier auf der Basis der Experimente von Van De Water (1974; Li et al., 1978) etabliert. Einige Modifikationen wurden für die Kultivierung der Sinnesepithelien vorgenommen (Kelley & Corwin, 1993; Warchol et al., 1993).

#### 2.2.13.1 Aufbau des Organkultursystems

Für die Kultivierung der Innenohrepithelien wurden Organkulturschalen von Falcon (60 x 15 mm) verwendet, welche in eine innere Kammer und einen äußeren Ring unterteilt sind. Im äußeren Ring wurden in sterilem, destilliertem Wasser getränkte Papiertücher angeordnet, die



der Befeuchtung des Inkubationsklimas in der Kultivierungsschale dienen. In die innere Kammer wurde ein Polycarbonatfilter (Durchmesser 13 mm, Porengröße 0.8  $\mu\text{m}$ ) gelegt, auf dem die Innenohrepithelien plaziert werden.

Zur Kultivierung von Sinnesepithelien wurden die Polycarbonatfilter mit dem Proteingemisch Cell Tak, welches als Anheftungsmatrix dient, zusätzlich beschichtet. Das Proteingemisch liegt in einer Konzentration von 1.08  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  in 5%iger Essigsäure vor. 2.5 - 3.0  $\mu\text{g}/\text{Filter}$  wurden eingesetzt. Hierfür wurden pro zu beschichtender Filter 2.5 - 3.0  $\mu\text{l}$  der Lösung in 100  $\mu\text{l}$  1M  $\text{NaHCO}_3$  verdünnt und die Verdünnung zur Inkubation für 20 min auf den Filter in der Organkulturschale gegeben. Im Anschluß wurde der Filter dreimal mit sterilem, destilliertem  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und getrocknet. Die gesamte Prozedur erfolgte unter sterilen Bedingungen. Die beschichteten, trockenen Schalen wurden unter der Sterilbank in einer Plastiktüte luftdicht verschlossen und konnten für 1 bis zwei Tage bei 4°C aufbewahrt werden.

Vor der Präparation wurden die Organkulturschalen entsprechend der Beschreibung vorbereitet und soviel Kulturmedium in den inneren Ring der Schalen gegeben, daß der Boden gerade bedeckt war. Die Schalen wurden im Inkubationsschrank vorgewärmt.

Die Innenohrepithelien wurden nach der Präparation in Hank's Salzlösung mit der Pipette (je nach Größe des isolierten Gewebes wurden die Pipettenspitzen abgeschnitten) zuerst in reines Kulturmedium (siehe Punkt 2.2.12) und dann in die Organkulturschalen überführt.

Für den Gasaustausch war es essentiell, daß das Gewebe während der Kultivierung nicht vollständig in dem Nährmedium eintaucht.

Der Aufbau des Innenohr-Organokultursystems ist in der Abbildung 5 schematisch gezeigt.

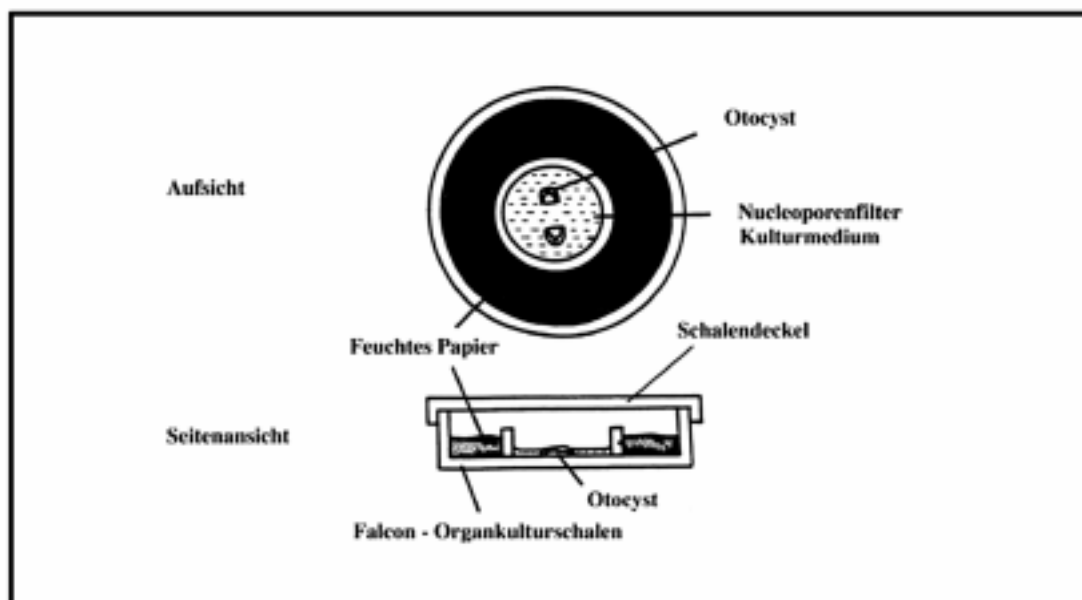


Abb. 5. Schematische Darstellung des Organokultursystems, das für Innenohr *in vitro* Studien optimiert wurde (aus Li et al., 1978)

**2.2.13.2 Verwendete Kulturmedien und Kultivierungsbedingungen**a) Für die Kultivierung von Otocysten:

Bestellmedium: *Neumann & Tytell serumfreies Medium* (100 ml, Gibco BRL)

Es wurden zugegeben:

1% L-Glutamin (100 fache Stammlösung)

100 U/ml Penicillin/Streptomycin (100 fache Stammlösung)

10% FCS

Mediumwechsel alle zwei Tage

Temperatur: 34.5°C

CO<sub>2</sub>: 5%

b) Für die Kultivierung der Sinnesepithelien:

Bestellmedium: *M-199* (100 ml, Gibco BRL)

enthält:	2200.0 mg/l NaHCO <sub>3</sub>	26 mM
	5960.0 mg/l Hepes	25 mM
	100 mg/l L-Glutamin	0.69 mM

Es wurden zugegeben:

20% FCS

100 U/ml Penicillin/Streptomycin

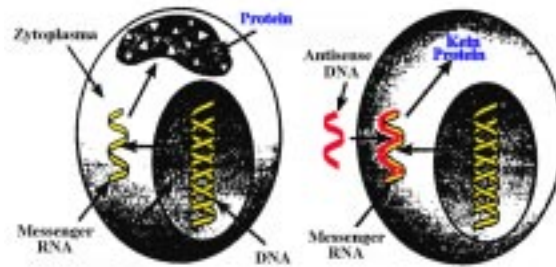
Mediumwechsel alle zwei Tage

Temperatur: 37°C

CO<sub>2</sub>: 5%

### 2.2.13.3 Zugabe von Antisense-Oligonukleotiden zum Kulturmedium

Das Prinzip der Inhibition der Translation selektiver Gentranskripte durch die Zugabe von Antisense-Oligonukleotiden ist in der Abbildung 6 schematisch dargestellt.



**Abb. 6. Schematische Representation der durch Antisense-Oligonukleotide vermittelten Inhibition der Genexpression (aus: Sharma & Narayanan, 1995).**

Es wurden, zur Inhibierung der *Pax-2* Translation die unter Punkt 2.1.7 beschriebenen Oligonukleotide verwendet, welche mit dem Kulturmedium zum Gewebe gegeben wurden. Die Oligonukleotide wurden in den hier aufgeführten Mengen geliefert.

AS14	896.2 µg, 143.8 nmol; MW = 6233 g/mol
S14	1204.4 µg, 200.5 nmol; MW = 5997 g/mol
SCR14	829.1 µg, 133 nmol; MW = 6233g/mol
AS17	902.6 µg, 144.6 nmol; MW = 6240 g/mol
S17	1008.3 µg, 168.3 nmol; 5991 g/mol
Fluorescein-markiert	1203 µg, 202,9 nmol; MW = 5928 g/mol

Die Oligonukleotide wurden als 1 mM Lösung in sterilem, bidestilliertem H<sub>2</sub>O aufgenommen und die Konzentration der angesetzten Stammlösungen über die Messung der optischen Dichte (1 µl DNA-Lösung in 1 ml H<sub>2</sub>O) bei 260 nm überprüft (siehe Punkt 2.2.3).

Es wurden Oligonukleotidkonzentrationen im Kulturmedium zwischen 2.5 µM und 50 µM eingesetzt. Unter sterilen Bedingungen wurde Kulturmedium (2.2.13.2-a) in geringen Mengen in Eppendorfgefäßen aliquotiert und die in H<sub>2</sub>O gelösten Oligonukleotide in den errechneten Volumina frisch zugegeben. In den Eppendorfgefäßen wurde das Medium vorgewärmt.

Die Kultivierungsbedingungen waren dieselben, wie unter Punkt 2.2.13.1/2 beschrieben. Oligonukleotide-enhaltendes Kulturmedium wurde täglich gewechselt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Genexpression im sich entwickelnden Innenohr der Maus

Ein erster Schritt, die der Innenohrentwicklung zugrunde liegenden molekularen Mechanismen aufzuklären, ist es, Gene zu identifizieren, die an der Determinierung und Differenzierung der verschiedenen Zelltypen des Innenohres beteiligt sind. Die Aktivität von Genen in definierten Strukturen und zu einem bestimmten Entwicklungszeitpunkt zeigt an, an welchen Prozessen die Moleküle, für die sie codieren, beteiligt sind und gibt Hinweise auf deren mögliche Funktion.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier Gene untersucht, die während der Embryonalentwicklung der Maus im sich entwickelnden Innenohr exprimiert werden. Die Transkripte dieser Gene konnten definierten Strukturen des Innenohres zugeordnet werden. Der Schwerpunkt lag dabei auf der Bestimmung des Expressionsmusters der in unserer Arbeitsgruppe klonierten Homeoboxgene *Nkx5-1* und *Nkx5-2* (Bober et al., 1994, Rinkwitz-Brandt et al., 1995). Vergleichend wurden die Expression des Paired box Gens *Pax-2*, das für einen Transkriptionsfaktor codiert (Dressler et al., 1990) und des Gens *sek* (Abkürzung für "segmentally expressed kinase") einer Rezeptorprotein Tyrosin Kinase; Nieto et al., 1992) untersucht.

Es wurden verschiedene Entwicklungsstadien analysiert, mit denen alle morphologischen Veränderungen des sich entwickelnden Innenohres, von der Ohranlage bis zum ausdifferenzierten Innenohr, erfaßt werden konnten. Dabei wurde eine frühe Phase, in der die einzelnen Teile des Innenohres ausgebildet werden und die durch Zelldeterminierungsprozesse und morphologische Veränderungen gekennzeichnet ist von einer späteren Phase, in der spezialisierte Zelltypen, insbesondere die Sinneszellen, differenzieren, unterschieden.

Die Bestimmung der Innenohr-Expression in jüngeren Embryonen erfolgte durch *whole mount* Hybridisierungen mit Digoxigenin-markierten Gentranskripten (siehe Punkt 2.2.7). Zur genauen Auswertung der Daten wurden die hybridisierten Embryonen in Gelatine eingebettet und mit einem Vibratom 30 - 50 µm dick geschnitten. Bei älteren Embryonen, ab E13.5, wurden die Innenohren einzeln entnommen und nach entsprechender Ausrichtung und Einbettung mit einem Mikrotom geschnitten. Zur Bestimmung der Gentranskriptverteilung wurden die 7 µm dicken Schnitte mit radioaktiv markierten Proben *in situ* hybridisiert (siehe Punkt 2.2.6). Die für die Hybridisierungen verwendeten Konstrukte sind unter Punkt 2.1.6 im Kapitel Material und Methoden beschrieben.

Die im folgenden gezeigten Fototafeln stellen eine repräsentative Auswahl der Hybridisierungsdaten dar.

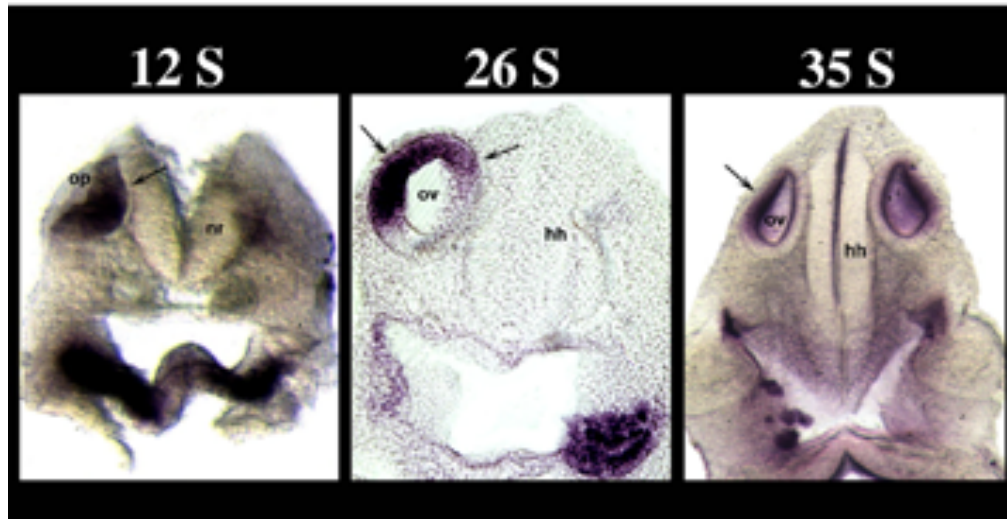
### 3.1.1 Genexpression während der Determinierungsprozesse der Ohranlage

Die frühen Entwicklungsstadien des Innenohres beinhalten eine Verdickung des ektodermalen Epithels zur Ohrplakode, der Anlage des Innenohrs, sowie nachfolgende, zahlreiche morphologische Veränderungen des Innenohrepithels. Die Zellen werden für die Ausbildung definierter Strukturen und spätere Differenzierungsprozesse determiniert. Diese Vorgänge werden durch Signale aus dem sich benachbart entwickelnden Hinterhirn gesteuert. Um diese verschiedenen Prozesse auf der Genexpressionsebene zu erfassen, wurden Mausembryonen der Entwicklungsstage 7.5 (Presomitenstadium, Neuralfalte), 8.0 (10 Somiten), 8.5 (12 Somiten), 9.5 (26 Somiten), 10.5 (35 Somiten), 11.5 und 12.5 untersucht.

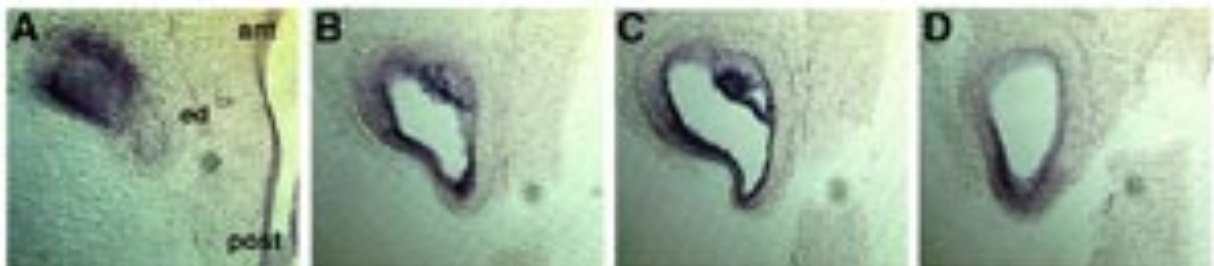
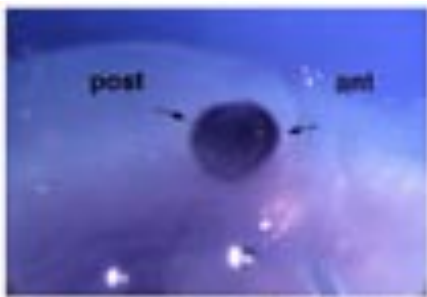
#### 3.1.1.2 Die frühe Expression des Homeoboxgenes *Nkx5-1*

Mausembryonen im Presomiten- (E7.5), und frühen Somitenstadium (E8.0, E8.5) wurden *whole mount* hybridisiert, um den Zeitpunkt der ersten Aktivierung des *Nkx5-1* Gens in der Ohrplakode zu bestimmen. Es zeigte sich, daß *Nkx5-1* Transkripte in der Ohrplakode erstmalig im 10 Somitenstadium (E8.5) nachweisbar sind. Hier sind die Transkripte in der anterioren Hälfte lokalisiert. Der posteriore Pol der Ohrplakode zeigt nur nach längerer Färbedauer schwache *Nkx5-1* Hybridisierungssignale. Die Expressionsdomäne ist im Ohrplakodenstadium dem Hinterhirn benachbart. Mit der Einstülpung des Innenohrepithels zum Ohrvesikel verlagert sie sich vom Hinterhirn fort nach dorsolateral (siehe Abbildung 7). Im 26 Somitenstadium (E9.5) sind Signale in der dorsomedialen und der dorsolateralen Wand des Otocysten zu detektieren. Lediglich die dorsomedial lokalisierten, *Nkx5-1* exprimierenden Zellen grenzen dem Hinterhirn noch an. Einen Entwicklungstag später, im 35 Somitenstadium, ist die mediale Wand frei von *Nkx5-1* Signalen (siehe Abb. 7, 8A).

**Abb. 7. *Nkx5-1* Expressions-domäne während der Formierung des Ohrvesikels, gezeigt an frontalen Vibratomschnitten durch einen *whole mount* hybridisierten Embryo. *Nkx5-1* exprimierende Zellen grenzen dem Hinterhirn im Plakoden - (12 Somiten, E8.5) und Ohrgruben - Stadium (nicht gezeigt) an und werden graduell in eine mehr dorsolaterale Position (26 Somiten, E9.5) verlagert. Im 35 Somiten - Embryo ist die Expressionsdomäne voll-ständig vom Hinterhirn abgerückt. (hh) Hinterhirn, (nr) Neuralfalte, (op) Ohrplakode, (ov) Ohrvesikel.**



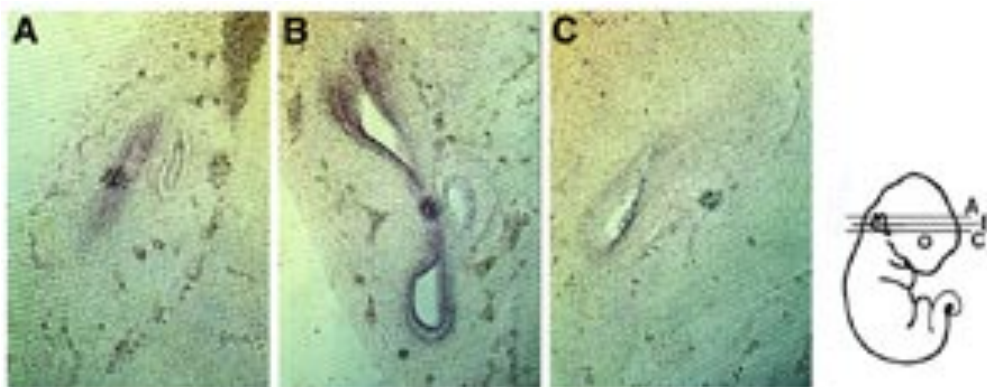
Die Expression des *Nkx5-1* Gens im fortgeschrittenen Otocystenstadium (35 Somiten) ist in der Abbildung 8 auf ausgewählten transversalen Schnitten aus vier verschiedenen Ebenen des Ohrvesikels illustriert. Es ist ersichtlich, daß sich die Transkripte auf die dorsale Hälfte konzentrieren. In der dorsalen Hälfte wird *Nkx5-1* Expression am anterioren Pol detektiert. In dieser Ebene ist auch die Anlage des endolymphatischen Ganges angeschnitten - hier wurden keine *Nkx5-1* Transkripte nachgewiesen. *Nkx5-1* Genaktivität wurde zudem in der lateralen Wand (8B) und am posterioren Pol (8C,D) des Otocysten detektiert. Die mediale Vesikelwand (8B-D) ist frei von Hybridisierungssignalen.



**Abb. 8. *Nkx5-1* Transkriptverteilung im E10.5 (35 Somiten) Embryo. Der *whole mount* hybridisierte Embryo zeigt *Nkx5-1* Signale in der dorsalen Hälfte des Otocysten. (A-D) Transversale Vibratomeschnitte (30µm) durch den gefärbten Embryo. (A) Hybridisierungssignale im anterioren Epithel des Ohrvesikels, die Anlage des endolymphatischen Ganges ist nicht gefärbt. (B,C) *Nkx5-1* Hybridisierung im lateralen und posterioren Epithel des Otocysten. (D) Die Schnittebene verläuft anterior durch den ventralen Otocysten, diese Region ist frei von Signalen. (ant) anterior, (ed) endolymphatischer Gang, (post) posterior.**

Am E11.5 werden morphogenetische Formveränderungen des Otocysten zur Ausbildung des vestibulären Apparates sichtbar. Durch Bewegung und Fusion der Epithelien bilden sich die Bogengänge, die als zwei taschenförmige Ausstülpungen nach anterior und posterior vom dorsalen Teil des Otocysten, noch ein Rudiment darstellen. Nach ventral wächst, als ein hakenförmiger Schlauch, die Cochlea aus (Martin and Swanson, 1993).

Abbildung 9 zeigt drei Schnittebenen durch den verschmälerten Otocysten, der endolymphatische Gang ist bereits deutlich abgegrenzt. *Nkx5-1* Hybridisierungssignale sind im Rudiment des anterioren (Abb. 9A) und posterioren Bogengangsepithels (Abb. 9B) lokalisiert. Außerdem weist das laterale Epithel des Otocysten, die Region, aus der sich am E12.5 der laterale Bogengang entwickelt, *Nkx5-1* Genaktivität auf (Daten nicht gezeigt). Die Schnittebene in Abbildung 9B führt auch durch die prospektive Ampullenregion des anterioren Bogenganges, welche durch ein charakteristisch verdicktes Epithel am anterioren Pol des Otocysten leicht zu erkennen ist (siehe Pfeil). Diese Region differenziert zum Sinnesepithel, der Crista. Sie zeigt, wie auch alle anderen Epithelbereiche, die sich später zu Sinnesorganen entwickeln, keine *Nkx5-1* Expression (vergl. Punkt 3.2.2, Abb. 29 - Expression des *Msx1* Gens, welches die Cristae markiert). Die Cochlea weist keine *Nkx5-1* Genaktivität auf (9C).



**Abb. 9. Expression des *Nkx5-1* Gens im E11.5 Otocysten. Transversale Vibratomeschnitte (30 µm) durch einen *Nkx5-1* whole mount hybridisierten Embryo.**

(A) Hybridisierungssignale in der Anlage des anterioren Bogenganges. (B) Signale in der Anlage des posterioren Bogenganges und im lateralen Epithel des verschmälerten Otocysten. Die Anlage der Crista des anterioren Bogenganges ist frei von Signalen (Pfeil). (C) Schnittebene durch die Cochlea, die keine *Nkx5-1* Transkripte aufweist. (aabg) Anlage des anterioren Bogenganges, (ant) anterior, (co) cochlea, (ed) endolymphatischer Gang, (post) posterior.



### 3.1.1.3 Die frühe Expression der Gene *Pax-2* und *Sek*

Es wurden E9.5 (26 Somiten) und E10.5 (35 Somiten) Embryonen mit Digoxigenin markierten *Pax-2* und *sek* Transkripten hybridisiert. Als Zeitpunkt der Anschaltung dieser Gene im Innenohr wurde für *Pax-2* (Nornes et al., 1990) der E9.0 und für *sek* der E9.5 (Nieto et al., 1992) beschrieben.

Die *sek* Probe zeigt nach kurzer Färbedauer (2h) Genexpression in einer mit *Nkx5-1* überlappenden Domäne im dorsolateralen Epithel der anterioren Hälfte des Otocysten an (Abb. 10C). Bei längerer Färbezeit (6h) wird, wie in Abbildung 11 illustriert, ein breiteres Expressionsmuster sichtbar. *Sek* Hybridisierungssignale werden entlang der gesamten anteroposterioren Achse des Ohrvesikels detektiert. Dabei weist auch die ventrale Hälfte des Otocysten Genaktivität auf. Anhand der in 11A und B gezeigten Gewebeschnitte ist deutlich sichtbar, daß die anteriore Expressionsdomäne am stärksten ausgeprägt ist.

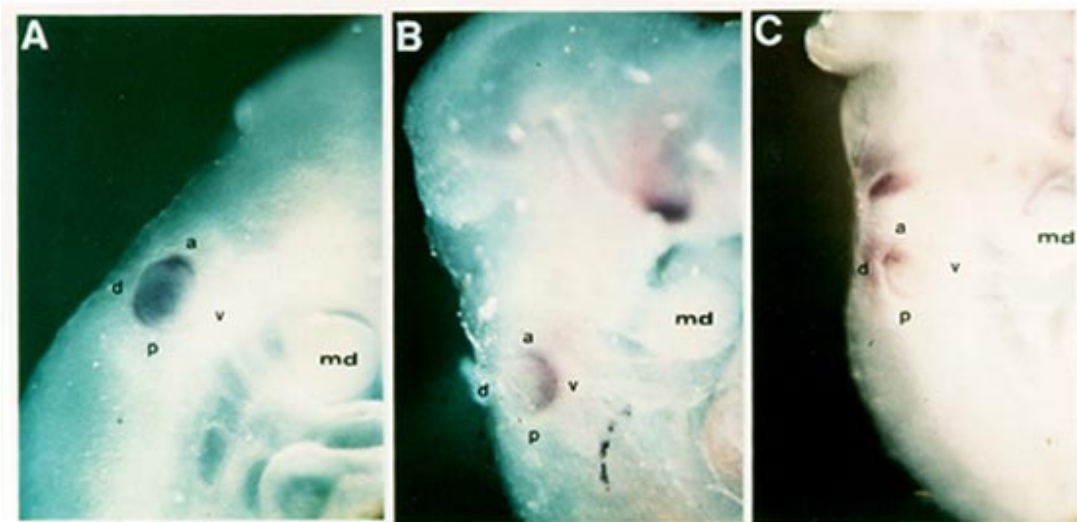
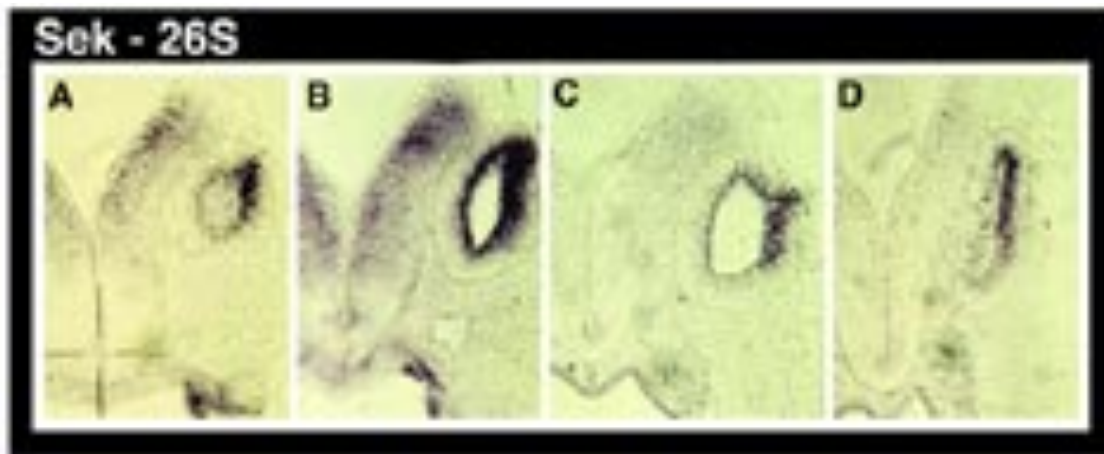


Abb. 10. *Nkx5-1*, *Pax-2* und *Sek* werden in verschiedenen Regionen im Ohrvesikel von E9.5 Embryonen (26 Somiten) exprimiert. (A) Die Expression von *Nkx5-1* ist auf die dorsale Hälfte des Ohrvesikels konzentriert. (B) *Pax-2* Hybridisierung in der ventralen Hälfte des Otocysten. (C) *sek* Signale in einer dorsolateralen Domäne im anterioren Teil des Otocysten. (a) anterior, (d) dorsal, (md) mandibular arch, (p) posterior.

Abb. 11. Verteilung der *sek* Transkripte im Otocysten eines Embryos im 26 Somitenstadium. In A-D sind frontale Gewebeschnitte durch den Otocysten von anterior nach posterior gezeigt. (A) Schnitt durch den vorderen Bereich des Vesikels - *sek* Expression ist hier im dorsolateralen Epithel angezeigt. (B) Eine weiter posterior gelegene Schnittebene zeigt *sek* Expression im gesamten Vesikelepithel an. Die Hybridisierungssignale sind in der medialen und ventralen Wand des Otocysten nur andeutungsweise zu sehen. Die dorsolaterale Expressionsdomäne ist stark ausgeprägt. C und D zeigen, daß sich die dorsolaterale Expressionsdomäne bis in den posterioren Teil des Otocysten zieht, diese ist hier aber weniger stark ausgeprägt. Die im übrigen Epithel angezeigte Genaktivität ist in diesem Bereich des Vesikels sehr gering.



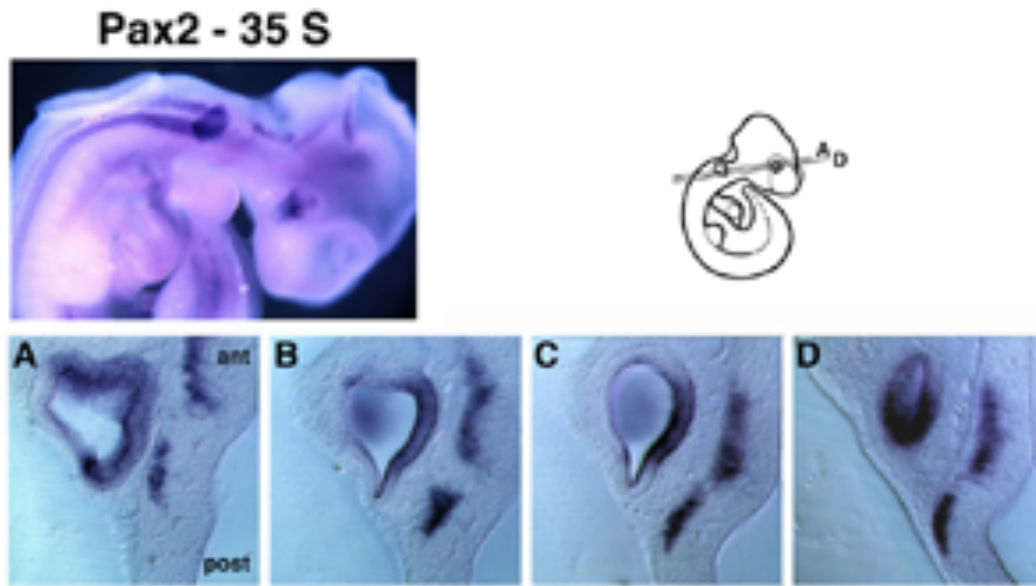


Die *Pax-2* Expressionsdomäne ist in Abbildung 10, vergleichend zur *Nkx5-1* und *sek* Expression, gezeigt. Anhand der hybridisierten Embryonen des Entwicklungsstages 9.5 (26 Somiten) ist zu sehen, daß sich die *Pax-2* Gentranskripte in einer zu *Nkx5-1* komplementären Expressionsdomäne im ventralen Otocysten verteilen.

In E10.5 Embryonen (35 Somiten) wurde die *Pax-2* Transkriptverteilung genauer untersucht. Die Abbildung 12 zeigt einen *whole mount* hybridisierten Embryo und Gewebeschnitte, die durch verschiedene Regionen des gefärbten Ohrvesikels führen. *Pax-2* hybridisierte Embryonen zeigen Signale im ventralen Otocysten, im Hinterhirn, im Neuralrohr, an der Mittel-/Hinterhirn Grenze und im Epithel des optischen Stiels.

Die Vibratomschnitte in 12A-D illustrieren die *Pax-2* Transkriptverteilung in der ventralen Hälfte des Otocysten. Hybridisierungssignale werden in der medialen Wand und am anterioren und posterioren Pol des Vesikels (12A) detektiert. Weiter ventral gelegene Regionen (12B,C) zeigen nur in der medialen Wand deutliche *Pax-2* Expression. Das laterale Vesikelepithel weist keine Genaktivität auf. Am ventralen Pol des Otocysten wird *Pax-2* im posterioren Epithel exprimiert (12D).

**Abb. 12. Verteilung der *Pax-2* Transkripte im E10.5 Embryo. In A-D sind transversale Vibratomschnitte von dorsal nach ventral gezeigt, die die genaue Lokalisation der Hybridisierungssignale im Otocysten wiedergeben. (A) Schnittebene durch die Mitte des Otocysten, Signale sind hier am anterioren und posterioren Pol und in der medialen Wand lokalisiert. B und C zeigen zwei weiter ventral gelegene Schnittebenen, *Pax-2* Hybridisierung ist in diesem Bereich nur in der medialen Wand zu sehen. (D) Schnitt durch die ventrale Spitze des Otocysten - Signale sind hier im Epithel des posterioren Pols lokalisiert.**



### 3.1.2 Genexpression während der Differenzierungsprozesse

Am Embryonalentwicklungstag 13.5 haben sich nacheinander der anteriore, posteriore und laterale Bogengang sowie deren ampulläre Erweiterungen, die die Sinnesepithelien beherbergen, gebildet. Ein zentraler utriculo-sacculärer Hohlraum hat sich formiert und die Cochlea zeigt bereits  $1\frac{1}{4}$  ihrer endgültigen  $1\frac{3}{4}$  Windungen. Zu diesem Zeitpunkt beginnen die Zelldifferenzierungsprozesse, die die verschiedenen spezialisierten Zelltypen des Innenohres bilden.

Die Wände des vestibulären Apparates bestehen aus einem einfachen cuboidalen Epithel, wogegen die Anlagen der Sinnesepithelien mehrschichtig sind. Die Cristae der Bogengänge sowie die Maculae von Utriculus und Sacculus bestehen zu diesem Entwicklungszeitpunkt aus einer Schicht Stützzellen, die fünf bis sechs Reihen dicht gepackte, ovoide Zellkerne enthält. Die Stützzellen sind von einer Reihe großer säulenförmiger Zellen überdeckt. Diese großen säulenförmigen Zellen sind die Vorläufer der Sinneszellen und zeichnen sich durch klares, eosinophiles Cytoplasma und große, ebenfalls klare Zellkerne aus. Die bei der Geburt ausdifferenzierten Cristae haben nur noch eine Reihe Stützzellen, überdeckt von einer einzelnen Reihe Sinneszellen. Die Maculae differenzieren bis zum E18.5 ebenfalls zu einem zweireihigen Epithel, das von einer dicken otolithischen Membran überlagert wird.

Die Cochlea zeigt am E13.5 noch wenig Differenzierung. Bis zur Geburt differenzieren innerhalb des knöchernen Ganges drei übereinanderliegende Kanäle (siehe Kapitel 1, Abb. 2). Der obere, die Scala vestibuli und der untere, die Scala tympani sind mit Perilymphe gefüllt und stehen miteinander in Verbindung. Zwischen den beiden Kanälen liegt der Ductus cochlearis, dessen Boden von einer Basalmembran, welche das Hörsinnesepithel, das

Cortische Organ, trägt, gebildet wird (siehe Punkt 3.1.2.3, Abb. 16). Die Ausdifferenzierung des Sinnesorganes dauert bei der Maus bis zum Tag 10 nach der Geburt an, rein äußerlich nimmt die Cochlea schon am E17.5 mit ihren  $1 \frac{3}{4}$  Windungen ihre adulte Form an.

Um die *Nkx5-1*, *Nkx5-2*, *Pax-2* und *sek* Transkripte definierten Strukturen des sich entwickelnden Innenohres zuordnen zu können, wurden Innenohren aus Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien isoliert, in Paraffin eingebettet und 5 µm dicke Gewebeschnitte mit radioaktiv markierten Antisense-RNA Proben (siehe Punkt 2.1.6 und 2.2.5) *in situ* hybridisiert.

Vorangegangene Untersuchungen haben die Transkriptverteilung von *Nkx5-1* und *Nkx5-2* im embryonalen Gehirn gezeigt (Rinkwitz-Brandt et al., 1995). Im Rahmen dieser Analyse wurde festgestellt, daß *Nkx5-2* Genaktivität erstmals am E14 nachweisbar ist. Einmal angeschaltet, wird das *Nkx5-2* Gen mit *Nkx5-1* räumlich identisch exprimiert. Die im folgenden dargestellte Auswahl an Hybridisierungsdaten steht damit immer stellvertretend für die Expression beider Gene und wird oft als *Nkx5* Expression bezeichnet.

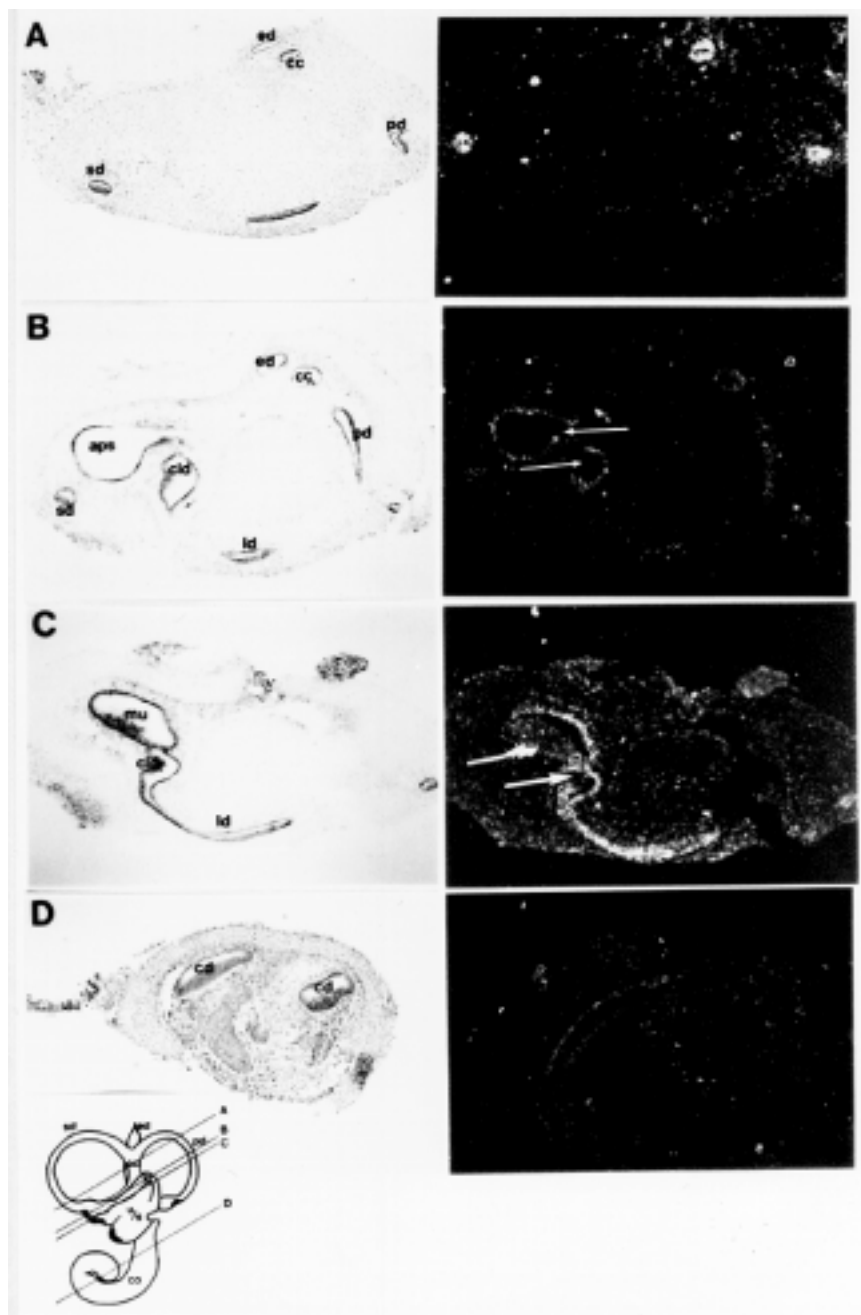
### 3.1.2.1 Expression der *Nkx5-1* und *Nkx5-2* Gene im vestibulären Apparat

Die Transkriptverteilung der Gene *Nkx5-1* und *Nkx5-2* wurde im Innenohr von E13.5, E14.5, E15.5, E17.5 Mausembryonen und in Neugeborenen zum Zeitpunkt der Geburt und 1.5 Tage postnatal bestimmt. Wie schon beschrieben, ist der Zeitpunkt für die Anschaltung des *Nkx5-2* Gens der Entwicklungstag 14. Ein Innenohr am E13.5 weist deshalb noch keine *Nkx5-2* Genaktivität auf. Zum Zeitpunkt der Geburt, am Tag 0.5 pn, können für beide *Nkx5* Gene die Transkripte nur noch schwach nachgewiesen werden. Hier wird das Expressionsmuster für beide Gene in E14.5 und E17.5 Innenohren beschrieben und gezeigt.

Die Morphologie der Innenohren am E14.5 entspricht, wie eingangs beschrieben, annähernd der eines adulten Innenohres, wobei die Ausdifferenzierung der spezialisierten Zelltypen innerhalb der Sinnesepithelien und des cochleären Ganges erst beginnt. Im Rahmen dieser Analyse wurde *Nkx5* Genexpression im dorsalen Teil des häutigen Labyrinths, dem vestibulären Apparat, detektiert. Zusätzlich werden die Gene am E15.5 im ventralen Teil des Innenohres, im cochleären Gang, angeschaltet.

Am Entwicklungstag 14.5 der Mausembryonen sind die Transkripte der *Nkx5* Gene ausschließlich im vestibulären Apparat lokalisiert. Hier werden *Nkx5-1* und *Nkx5-2* in der epithelialen Zellschicht der drei Bogengänge und deren Ampullen sowie des utriculosacculären Raumes exprimiert. Die Anlagen der Sinnesepithelien weisen dabei keine Genaktivität auf. Der endolymphatische Gang (Abb. 13A,B) und die Cochlea (Abb. 13C) zeigen ebenfalls keine *Nkx5* Genexpression. Insgesamt gesehen ist die *Nkx5* Genexpression auf die nicht-sensorischen, epithelialen Zellen des Innenohres begrenzt. Weder im Mesenchym noch in den Sinnesepithelien werden diese beiden Gene exprimiert.

Die Abbildung 13 stellt eine Auswahl an Hybridisierungsdaten von E14.5 Innenohren dar, die die *Nkx5* Genexpression in den Bogengängen (13A), im ampullären, nicht-sensorischen Epithel (13B) und im Utriculus (13C) zeigen. Die Schnittebenen sind schematisch angegeben. Das Expressionsmuster der *Nkx5* Gene bleibt bis zum Ende der fetalen Entwicklungsperiode generell unverändert. Die einzige, zu den bereits beschriebenen, zusätzliche Expressionsdomäne erscheint am E15.5 in der Cochlea (Abb. 14B,F). Diese *Nkx5* exprimierende Struktur konnte als Stria vascularis identifiziert werden und wird in Kapitel 3.1.2.3 gesondert beschrieben.



**Abb. 13. *Nkx5-1/Nkx5-2* Genexpression im sich entwickelnden Innenohr von E14.5 Embryonen.** Es sind transversale, *in situ* hybridisierte Gewebeschnitte durch verschiedene Ebenen des vestibulären (A-C) und cochleären Apparates (D) präsentiert. *Nkx5* Gentranskripte sind im gesamten nicht-sensorischen Epithel des vestibulären Apparates lokalisiert - hier gezeigt im anterioren und posterioren Bogengang einschließlich der crus commune (A), in den Bogengangsampullen (B), im Utriculus sowie im lateralen Bogengang und dessen Ampulle (C). Die Transkripte fehlen in den sensorischen Epithelien (Pfeile in B und C), in der Cochlea (D) und ebenso im endolymphatischen Gang (A). (aps) Ampulle des posterioren Bogenganges, (cc) Crus commune, (cd) Cochleärer Gang, (cld) Crista des lateralen Bogenganges, (co) Cochlea, (ed) Endolymphatischer Gang, (ld) lateraler Bogengang, (mu) Macula utriculi, (pd) posteriorer Bogengang, (s) Sacculus, (sd) superiorer (= anteriorer) Bogengang, (u) Utriculus.

### 3.1.2.2 Vergleich der Expressionsmuster der *Nkx5.1/5.2*, *Pax-2* und *sek* Gene im E17.5 Innenohr

Die räumliche Verteilung der *Nkx5-1* Transkripte in verschiedenen Stadien der Innenohrentwicklung schien von Beginn an mit den Strukturen des vestibulären Systems zu korrelieren. Dies ließ vermuten, daß das *Nkx5-1* Gen das Schicksal einzelner Teile des Innenohrs bereits im Vesikelstadium durch spezifische Expression markiert. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit sollte die Expression anderer, bereits im Vesikelstadium asymmetrisch aktiver Gene, im fetalen Ohr überprüft und mit *Nkx5-1* verglichen werden. Besonders interessant war die Überprüfung der *Pax-2* Expression, da dieses Gen im Otocysten ein zu dem *Nkx5-1* Gen nahezu komplementäres Muster aufwies. Darüber hinaus wurde die Expression des mit *Nkx5-1* im Vesikelstadium teilweise überlappend exprimierenden Gens *sek* überprüft.

Der Vergleich der Expressionsmuster wurde an E17.5 Innenohren durchgeführt (Abb. 14). In diesem Stadium sind alle Strukturen des Innenohres gebildet und die Zelldifferenzierung in spezifischen Regionen hat begonnen oder ist bereits abgeschlossen. Die Expression der Gene ist in diesem Stadium am stärksten ausgeprägt und nimmt später kontinuierlich ab.

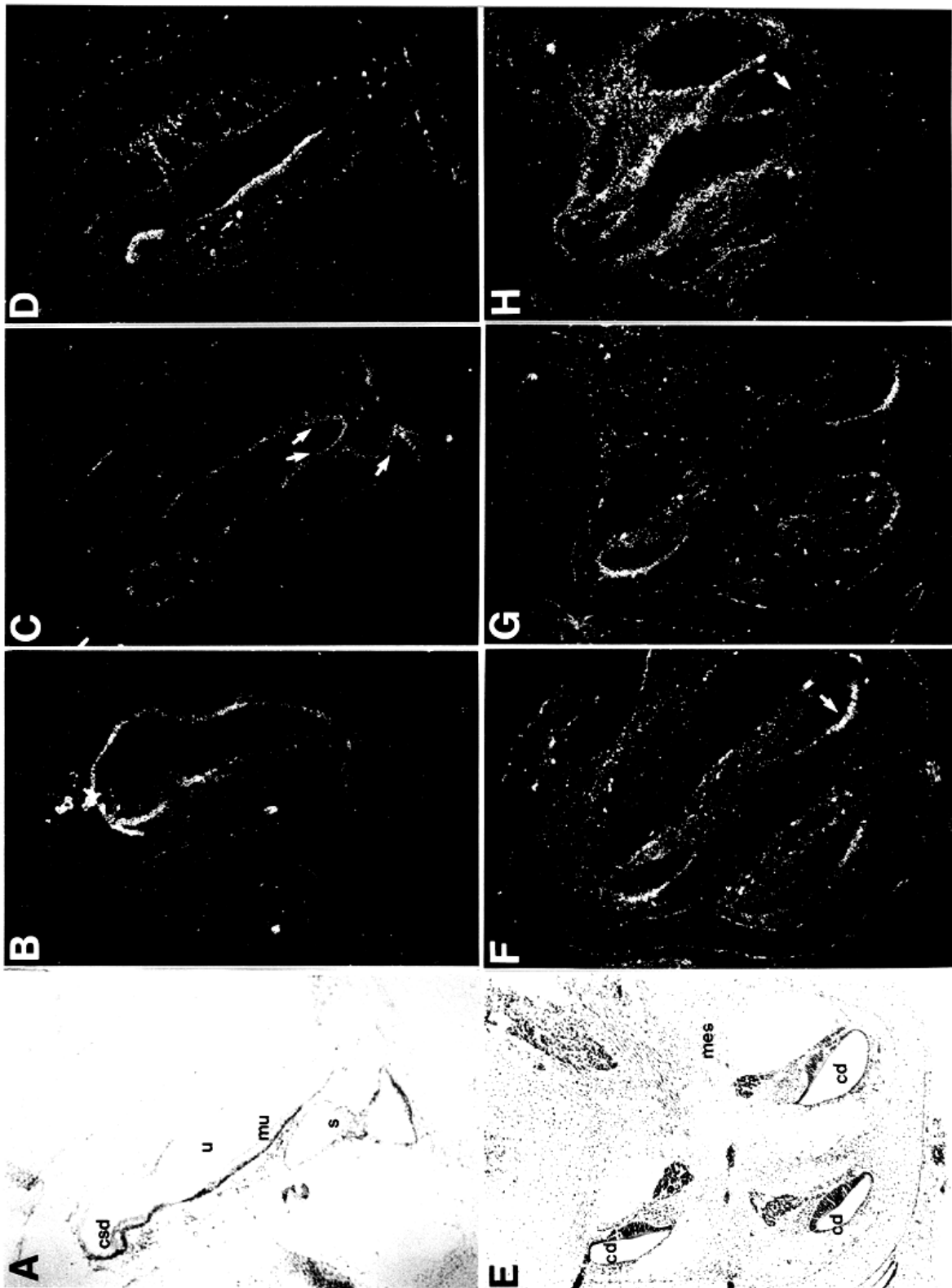
Die obere Bildreihe der Abbildung 14 (A-D) illustriert die Transkriptverteilung im ventralen Bereich des vestibulären Apparates, in dem *Nkx5-1/Nkx5-2*, *Pax-2* und *sek* überlappend exprimiert werden. Gezeigt sind die Ampulle des anterioren Bogenganges, der Utriculus und der Sacculus.

*Pax-2* zeigt im fetalen Innenohr ein mit *Nkx5-1* und *Nkx5-2* teilweise überlappendes Expressionsmuster. Transkripte werden im ventralen Teil des vestibulären Apparates - hier in dem Epithel und den Maculae von Utriculus und Sacculus (14C) und im Ductus cochlearis (14G) detektiert. Es ist zu sehen, daß auch im cochleären Gang die Expressionsdomäne von *Pax-2* mit der der *Nkx5* Gene (14F) überlappt, diese Expression wird aber aufgrund der hohen Spezialisierung des Hörorgans in Kapitel 3.1.2.3 gesondert beschrieben. *Sek* zeigt ein zu *Nkx5-1* und *Nkx5-2* vollständig komplementäres Expressionsmuster. Es wird im vestibulären Apparat, der aus dem dorsalen Teil des Otocysten entsteht, ausschließlich in den Sinnesepithelien, den drei Cristae und den beiden Maculae exprimiert. Abbildung 14 zeigt

*sek* Hybridisierungssignale in der Crista des anterioren Bogenganges und der Macula des Utriculus (D) im Vergleich zur *Nkx5* Expression im nicht-sensorischen Epithel (B). Die breiteste *sek* Expression wird in der Cochlea detektiert (H). Hier sind *sek* Transkripte nicht nur im Epithel des cochleären Ganges, sondern auch im lockeren Mesenchym, das mit der Scala vestibuli und der Scala tympani den perilymphatischen Raum begrenzt, lokalisiert. Die Stria vascularis, in der die *Nkx5* Gene exprimiert werden, ist eine der wenigen cochleären Strukturen, in der keine *sek* Genaktivität nachweisbar ist (siehe Pfeil in 14H).

Die Expression im differenzierenden Innenohr ist für *Pax-2* bis 1.5 Tage und für *sek* bis 3.5 Tage nach der Geburt in den genannten Strukturen nachweisbar.

**Abb. 14.** Vergleichende Expressionsanalyse der Gene *Nkx5-1/Nkx5-2* (B,F), *Pax-2* (C,G) und *sek* (D,H) im sich entwickelnden Innenohr von E17.5 Mausembryonen. Gezeigt sind *in situ* hybridisierte, sagittale Gewebeschnitte durch den vestibulären (obere Reihe, A-D) und cochleären (untere Reihe, E-H) Apparat. Die Hellfeldbilder (A,E) sind repräsentativ für die Schnittebenen, die in B-D und in F-H präsentiert sind - A zeigt die Ampulle des vorderen Bogenganges und deren Crista sowie den Utriculus mit Macula und den Sacculus, B zeigt die Cochlea. *Nkx5* Gentranskripte werden nur in der dünnen nicht-sensorischen epithelialen Zellschicht des Innenohres detektiert. Im vestibulären Teil (B) sind Hybridisierungssignale im gesamten nicht-sensorischen Epithel zu finden, wogegen in der Cochlea die Stria vascularis die einzige *Nkx5* Gen exprimierende Struktur darstellt (Pfeile in F). *Pax-2* wird in der ventralen Hälfte des Innenohres, teilweise räumlich überlappend mit den *Nkx5* Genen, exprimiert. (C) Die Pfeile markieren den ventralen Teil des Utriculus und die laterale Wand des Sacculus. (G) In der Cochlea sind *Pax-2* Gentranskripte in der Stria vascularis und in der Prominentia spiralis lokalisiert (siehe auch Abb. 15). *Sek* Hybridisierungssignale werden in einem zu *Nkx5-1* und *Nkx5-2* komplementären Muster detektiert. (D) *Sek* Expression im sensorischen Epithel des vestibulären Apparates. (H) In der Cochlea wird *sek* in epithelialen und mesenchymalen Zellen exprimiert. Die Stria vascularis (siehe Pfeil) ist frei von *sek* Hybridisierungssignalen. (cd) Cochleärer Gang, (csd) Crista des anterioreren Bogenganges, (mes) Mesenchym, (mu) Macula utriculi, (s) Sacculus, (u) Utriculus.



Die Abbildung 15 verdeutlicht noch einmal die komplementäre Expression von *Nkx5-1* und *sek* im vestibulären Apparat. *Nkx5-1* Hybridisierungssignale sind im nicht-sensorischen Epithel der Ampullen des anterioren und lateralen Bogenganges (15B) und des Utriculus (15F) erkennbar. In den angrenzenden Sinnesepithelien, die keine *Nkx5* Genaktivität aufweisen, wird *sek* exprimiert (15D,H).

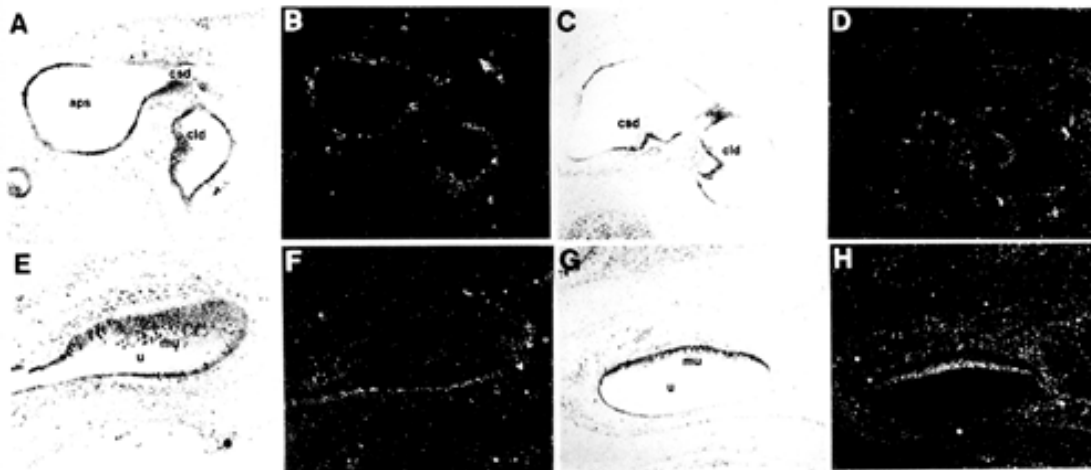


Abb. 15. Vergleich der Expressionsdomänen von *Nkx5-1/Nkx5-2* und *sek* in den sensorischen Regionen des vestibulären Apparates im sich entwickelnden Innenohr von E17.5 Mausembryonen. A,B,E,F sind repräsentativ für die *Nkx5* und C,D,G,H für die *sek* Genexpression. Hell- und Dunkelfeldaufnahmen sind für jeden Schnitt gezeigt. (aps) Ampulle des superioren (=anterioren) Bogenganges, (cld, csd) Crista des lateralen, anterioren Bogenganges, (mu) Macula utriculi, (u) Utriculus.

### 3.1.2.3 Genexpression im Ductus cochlearis

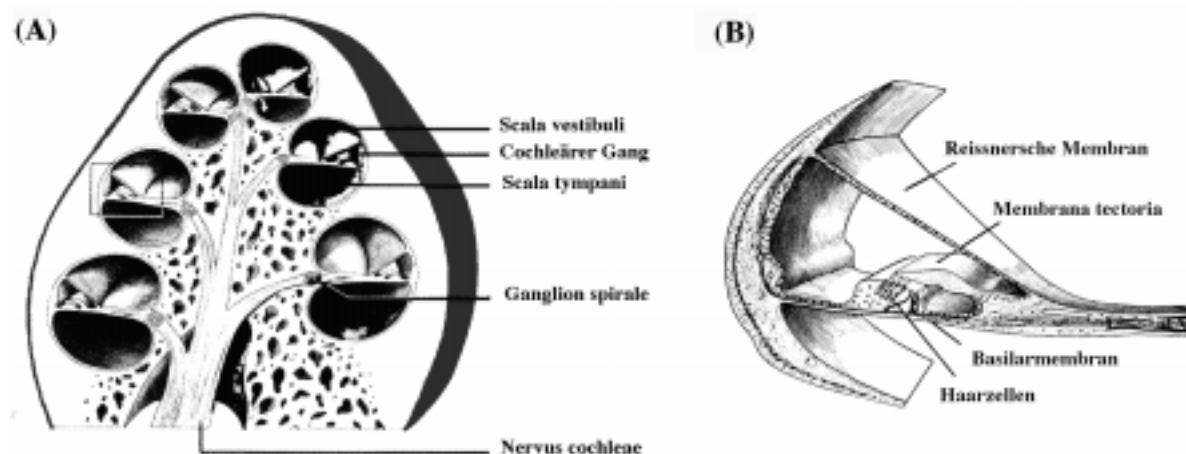


Abb. 16. (A) Schnitt durch die Cochlea in Richtung der Längsachse, nach Rohen. (B) Teil des häutigen cochleären Ganges (siehe Kästchen in A) in dreidimensionaler Darstellung, nach Neubert. (aus: Thews et al., 1989)



Der Ductus cochlearis ist ein sehr spezialisierter, häutiger Kanal im knöchernen Gang der Cochlea, der über seine gesamte Länge ein hochkomplexes Sinnesepithel, das Cortische Organ beherbergt. Die verschiedenen Strukturen, welche für die Ausübung seiner Funktion wichtig sind und die spezifische Genexpression zeigen, sind in Abb. 17F illustriert und benannt.

In dem hier untersuchten Stadium (E17.5) hat die Spezialisierung der Zelltypen zur Ausbildung der spezifischen Strukturen bereits eingesetzt und die Cochlea zeigt mit 1 3/4 Windungen ihre adulte Form.

Die *Nkx5* Gene werden in einer einzigen Struktur in der lateralen Wand des cochleären Ganges exprimiert. Diese Struktur konnte als die Stria vascularis identifiziert werden, welche aus einer inneren, epithelialen und einer äußeren, mesenchymalen Schicht besteht. *Nkx5* Gentranskripte sind hier in den epithelialen Zellen lokalisiert (17B). *Pax-2* wird, mit *Nkx5-1* und *Nkx5-2* überlappend, ebenfalls in der epithelialen Schicht der Stria vascularis exprimiert. Daneben zeigt auch die Prominentia spiralis *Pax-2* Expression (17D). *Sek* zeigt das breiteste Expressions-muster in der Cochlea (17C). Gentranskripte wurden in den epithelialen Zellen des Limbus spiralis, im Sulcus spiralis internus, in der Prominentia spiralis und in der Reissnerschen Membran detektiert. Auch das Mesenchym in der Cochlea, das den perilymphatischen Raum umgibt, einschließlich der Endothelien, die die Wände der Scala vestibuli und der Scala tympani bilden, weisen *sek* Genaktivität auf. Es war deutlich zu sehen, daß die Stria vascularis frei von *sek* Transkripten ist (17C). Schwache *Pax-2* und *sek* Hybridisierungssignale wurden auch in der Anlage des Cortischen Organs detektiert (Daten nicht gezeigt).

Die Expressionsdaten sind noch einmal in Abbildung 18 schematisch zusammengefaßt.

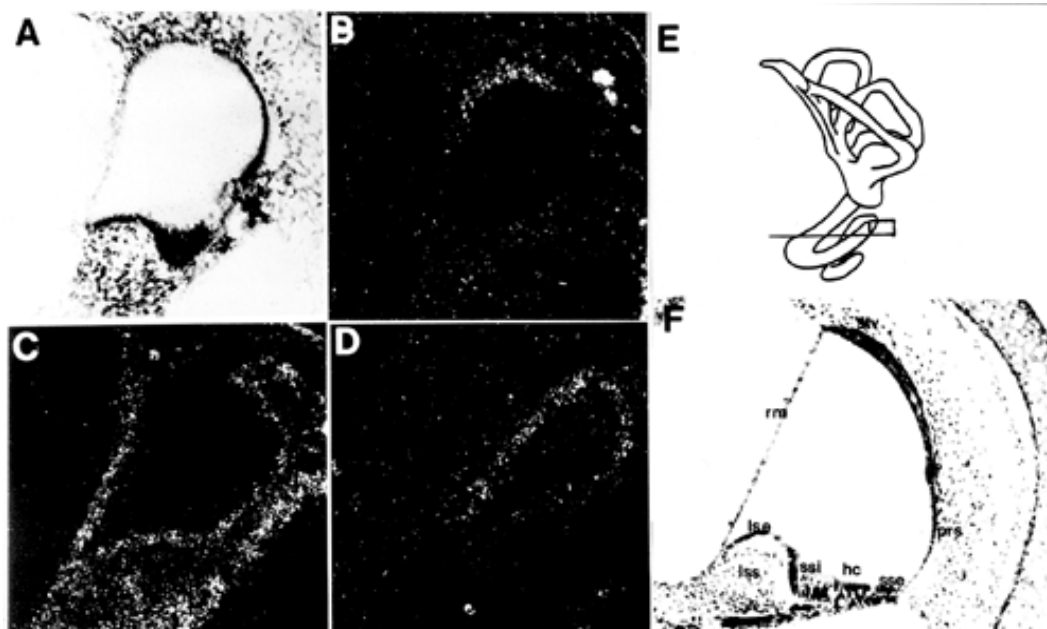


Abb. 17. Vergleichende Expressionsanalyse der *Nkx5-1/Nkx5-2*, *Pax-2* und *sek* Gene im cochleären Gang des sich entwickelnden Innenohres von E17.5 Embryonen. (A) Repräsentatives Hellfeldbild (B) *Nkx5* Genexpression in der Stria vascularis. (C) *sek* Expression in der Reissnerschen Membran, in der Prominentia spiralis, im Sulcus spiralis internus, in den epithelialen Zellen des Limbus spiralis sowie in den cochleären Gang umgebenden mesenchymalen Zellen. (D) *Pax-2* Expression in der Anlage der Stria vascularis und der Prominentia spiralis im cochleären Gang am E14.5. Die Schnittebenen sind schematisch in E gezeigt. F zeigt einen Schnitt durch den ausdifferenzierten Ductus cochlearis mit Beschriftung der Strukturen. (hc) Haarzellen, (lse) Epitheliale Zellen des Limbus spiralis, (lss) Stromazellen (mesenchymal) des Limbus spiralis, (prs) Prominentia spiralis, (rm) Reissnersche Membran, (sse, ssi) Sulcus spiralis externus, internus, (stv) Stria vascularis.

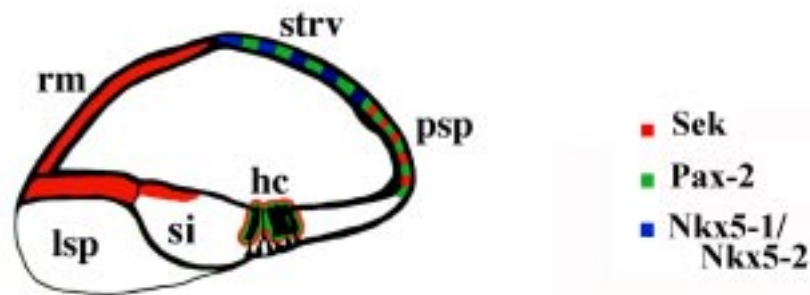


Abb. 18. Schematische, zusammenfassende Darstellung der Expressionsdomänen von *Nkx5-1/Nkx5-2*, *Pax-2* und *sek* im cochleären Gang. (hc) Haarzellen, (lsp) Limbus spiralis, (psp) Prominentia spiralis, (rm) Reissnersche Membran, (si) Sulcus spiralis internus, (stv) Stria vascularis.

### 3.1.2.4 Tabellarische Zusammenfassung der Expressionsdomänen im differenzierenden Innenohr

In der nachfolgenden Tabelle sind die Expressionsdomänen der *Nkx5-1*, *Nkx5-2*, *Pax-2* und *sek* Gene im differenzierenden Innenohr, beginnend mit dem Embryonalentwicklungstag 12.5, bis zum Tag 3.5 postnatal tabellarisch zusammengefaßt.

#### Expressionsdomänen

	<i>Nkx5-1/5.2</i>	<i>Pax-2</i>	<i>sek</i>
<b>E12.5</b>	Epithel der Anlage der Bogengänge und deren Ampullen - die Anlagen der sensorischen Epithelien ausgenommen	Epithel des utrículo-sacculären Hohlraumes einschließlich der Anlage der sensorischen Epithelien	Anlage der Sinnesepithelien im utrículo-sacculären Raum, anteriore Wand des cochleären Ganges

<b>E13.5</b>	wie für E12.5 angegeben	wie für E12.5 angegeben	Mesenchym in der Cochlea, undifferenzierter cochleärer Gang
<b>E14.5</b>	Nicht-sensor. Epithelien des vestib. Apparates (Bogengänge und deren Ampullen, Utriculus).	Epithel im ventralen Utriculus und im Sacculus, einschließlich der Maculae; Anlage der Stria vascularis und der Prominentia spiralis im cochleären Gang	Cristae der Bogengänge, Maculae von Utriculus und Sacculus, Mesenchym der Cochlea, undifferenzierter cochleärer Gang.
<b>E15.5</b>	wie für E14.5 angegeben, Stria vascularis in der Cochlea	wie für E14.5 angegeben	wie für E15.5 angegeben.
<b>E17.5</b>	wie für E15.5 angegeben	wie für E14.5 angegeben, Anlage des Cortischen Organs	Cristae, Maculae, Mesenchym in der Cochlea (hier das Endothel der Scala vestibuli und tympani), cochleärer Gang: Reissnersche Membran, Prominentia spiralis, Epithelzellen des Limbus spiralis und des Sulcus internus, Anlage des Cortischen Organs
<b>0.5pn</b>	Epithel der Bogengänge und deren Ampullen	Macula utriculi und sacculi, Stria vascularis, Prominentia spiralis	wie für E17.5 angegeben
<b>1.5pn</b>	keine Expression	schwache Expression in den für 0.5pn angegebenen Strukturen	wie für E17.5 angegeben, die Reissnersche Membran zeigt keine Expression mehr
<b>3.5pn</b>	keine Expression	keine Expression	Macula utriculi und sacculi, cochleäres Mesenchym, Prominentia spiralis.

Tab. 1. Zusammenfassung der Genexpressionsdomänen im differenzierenden Innenohr.

### 3.2 Genexpression im Innenohr von Hinterhirn-Mausmutanten

Viele Ohrdefekte sind auf Defekte im angrenzenden Hinterhirn zurückzuführen, das die zur Ausbildung des Innenohres notwendigen Faktoren sezerniert.

Es ist von besonderem Interesse herauszufinden, ob die Expression innenohrspezifischer Gene in Mäusen mit Mißbildungen des Hinterhirns verändert ist. Für diese Analyse wurden die Hinterhirnmutanten *Hoxa-1* und *plotch* ausgewählt.

#### 3.2.1 Untersuchung der *Nkx5-1* Genaktivität in *Hoxa-1* *-/-* Mausmutanten

*Hoxa-1* Mausmutanten wurden durch die gezielte Inaktivierung des *Hoxa-1* Gens, das in E7.5 und E8.0 im sich formierenden Rhombencephalon (Hinterhirn) exprimiert wird, erzeugt (Chisaka et al., 1992).

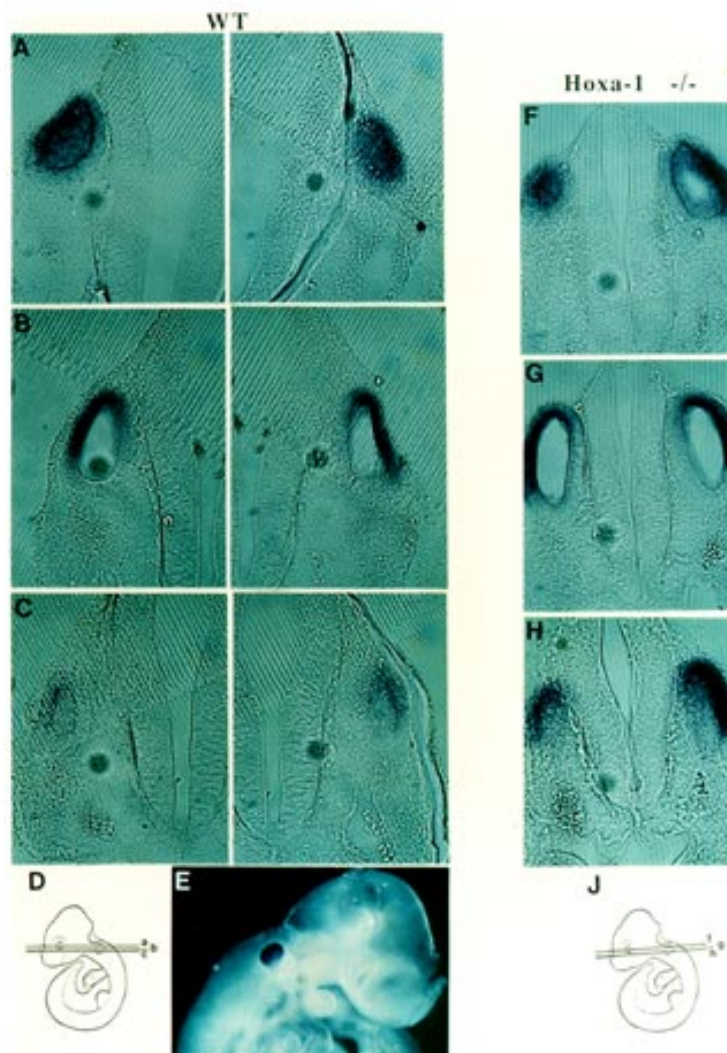
Die Mäuse zeigen eine gestörte Hinterhirnentwicklung, die sich im Fehlen des Rhombomer 5, welches als Quelle der „ohrinduzierenden“ und „ohrerhaltenden“ Signale ausgemacht wurde (siehe Einleitung Kap. 1), äußert. Trotz der Hinterhirnanomalien verlaufen die Invagination der Ohrplakode und der Zusammenschluß des Epithels zum Ohrvesikel normal. In späteren Entwicklungsstadien jedoch weist das Innenohr erhebliche Mißbildungen auf (Mark et al., 1993).

Die *Nkx5-1* Genexpression wurde in frühen embryonalen Stadien der *Hoxa-1* *-/-* Mutanten untersucht.

Heterozygote und homozygote *Hoxa-1* mutante Embryonen haben wir im Rahmen einer Kollaboration von Dr. Rijli aus dem Labor von P. Chambon (Straßburg) erhalten. Wildtyp Embryonen aus demselben Wurf wurden als Kontrollen für die Hybridisierungen ebenfalls mitgesendet. Alle Embryonen wurden mit einer Digoxigenin-markierten *Nkx5-1* Probe nach der *whole mount* Prozedur hybridisiert.

Die Abbildung 19 stellt *Nkx5-1* Hybridisierungsdaten in Wildtyp und *Hoxa-1* *-/-* Embryonen vom Entwicklungstag 9.5 (26 Somiten) dar. 19F-H zeigen Vibratomschnitte durch den Ohrvesikel eines *whole mount* hybridisierten *Hoxa-1* *-/-* Embryos. Auf diesen Schnitten ist *Nkx5-1* Expression im dorsolateralen Ohrvesikelepithel sichtbar. Ein Vergleich dieser Hybridisierungssignale mit Signalen in Wildtyp Kontrollembryonen (19A-C), zeigte, daß in den Mutanten die Expression des *Nkx5-1* Gens generell unverändert ist.

**Abb. 19. *Nkx5-1* Expression im Ohrvesikel eines *Hoxa-1* *-/-* Embryos im 26 Somitenstadium (E9.5).** Transversale Schnitte von dorsal nach ventral durch *whole mount* hybridisierte Embryonen zeigen *Nkx5-1* Hybridisierungssignale im rechten und linken Ohrvesikel von Wildtyp (A-C) und *Hoxa-1* *-/-* (F-H) Embryonen. Die Schnittebenen sind für den Wildtyp Embryo in D und für den mutierten Embryo in J schematisch angegeben. Die Bilder sind jeweils so angeordnet, daß der posteriore Teil des Vesikels oben im Bild gezeigt ist. In E ist ein gesamter mit *Nkx5-1* hybridisierter *Hoxa-1* *-/-* Embryo gezeigt.



### 3.2.2 Die *splotch* - Mutante

Der Phänotyp der *splotch* Mäuse ist auf eine Mutation im *Pax3* Gen zurückzuführen (Epstein et al., 1991). Homozygote *splotch* Mutanten weisen unter anderem Neuralrohranomalien auf und sterben am E13.5 im Mutterleib ab (Franz, 1989). Die Neuralrohrmißbildungen basieren auf einem inkompletten Neuralrohrschluß, der bei den verschiedenen Embryonen variabel ausfällt, aber immer in der sacrocaudalen Region vorhanden ist. In den mißgebildeten Regionen proliferiert das neurale Gewebe extensiv und neigt sich nach distal. 70% der homozygoten Embryonen weisen den Neuralrohrdefekt in der Kopf- und Thoraxregion auf - in diesen Mutanten ist die Innenohrentwicklung erheblich gestört (Deol, 1966). Die Invagination des Vesikelepithels und die Position des Otocysten erscheinen normal, erst mit

Beginn der epithelialen Bewegungen zur Ausbildung des vestibulären Apparates in E11.5 (siehe Einleitung) wird der anormale Innenohrphänotyp sichtbar.

Die Etablierung eines heterozygoten *plotch* Mausstammes erfolgte durch Verpaarung von C57 Wildtyp Weibchen mit einem heterozygoten *plotch* Männchen, das dem Labor zur Verfügung gestellt wurde (siehe Punkt 2.1.8). Die heterozygoten Tiere wurden an ihrer Pigmentstörung im Fell, die sich durch einen weißen Fleck am Abdomen äußert, erkannt. Homozygote Embryonen für die Analyse wurden aus heterozygoten *plotch* Verpaarungen erhalten. Es wurden nur solche Embryonen analysiert, die den inkompletten Neuralrohrschluß im Hinterhirn aufwiesen. Da ausreichende Mengen an Embryonen zur Verfügung standen, wurde neben der Expression des *Nkx5-1* Gens die Expression von *Pax-2*, eines weiteren innenohrspezifischen Markergens untersucht.

### 3.2.2.1 *Nkx5-1* Genexpression in *plotch* Embryonen

Die *Nkx5-1* Transkriptverteilung wurde in *plotch* Embryonen am E10.5 und E11.5 untersucht und mit der Wildtyp Expression verglichen. Die Abbildung 20 zeigt *whole mount* Hybridisierungsdaten in E10.5 Embryonen. Es ist deutlich zu sehen, daß in *plotch* Embryonen das *Nkx5-1* Gen, wie auch in Wildtyp Embryonen detektiert, vorwiegend in der dorsalen Hälfte des Otocysten exprimiert wird (20E). Die transversalen Vibratomschnitte (20f-h) zeigen die Transkriptverteilung in der *plotch* Mutante im dorsolateralen Vesikelepithel entlang der gesamten anteroposterioren Achse des Otocysten. Vergleichend sind daneben Schnitte durch einen *whole mount* hybridisierten Wildtyp Embryo gezeigt (20b-d).

Am E11.5 werden erste Mißbildungen der Innenohranlage in den *plotch* Mutanten sichtbar. Der Ohrvesikel ist, im Vergleich zum verschmälerten, invaginierenden Otocysten von Wildtyp Embryonen, deutlich erweitert.

Die Abbildung 21 zeigt Vibratomschnitte durch *Nkx5-1 whole mount* hybridisierte E11.5 Embryonen. Die Verteilung der *Nkx5-1* Transkripte erscheint in Wildtyp (21a) und *plotch* Embryonen (21b) identisch. Die Schnitte wurden durch die invaginierende dorsale Hälfte des Otocysten geführt und zeigen Hybridisierungssignale im lateralen und posterioren Vesikelepithel. Die mediale Wand sowie der endolymphatische Gang sind frei von Signalen. Das verdickte Epithel im anterioren Bereich stellt die Anlage der Crista des anterioren Bogenganges dar - diese Region weist ebenfalls weder in Wildtyp noch in *plotch* Embryonen *Nkx5-1* Genaktivität auf.

**Abb. 20. *Nkx5-1* Expression im Ohrvesikel von E10.5 *plotch* Embryonen (E,f,g,h) im Vergleich zur Wildtyp Expression (A,b,c,d). Die Ebenen für die transversalen Schnitte durch die Embryonen sind in dem Schema angegeben. Die fotografierten Schnitte zeigen als Ausschnitt den linken Ohrvesikel - hier ist der anteriore Teil jeweils oben im Foto zu sehen. (post) posterior, (ant) anterior, (dors.) dorsal, (vent.) ventral.**

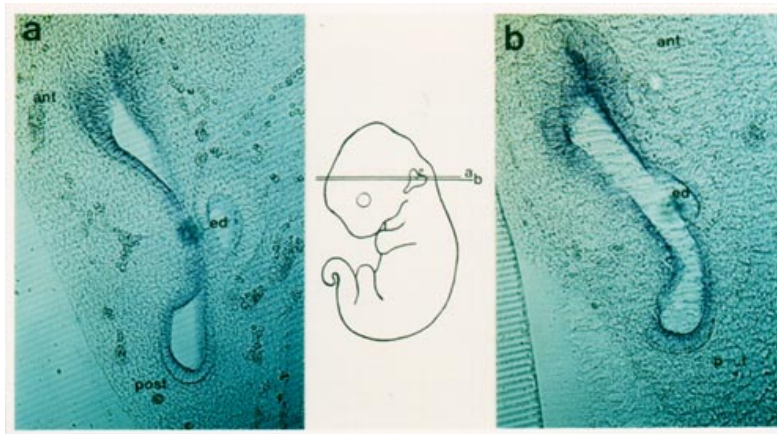
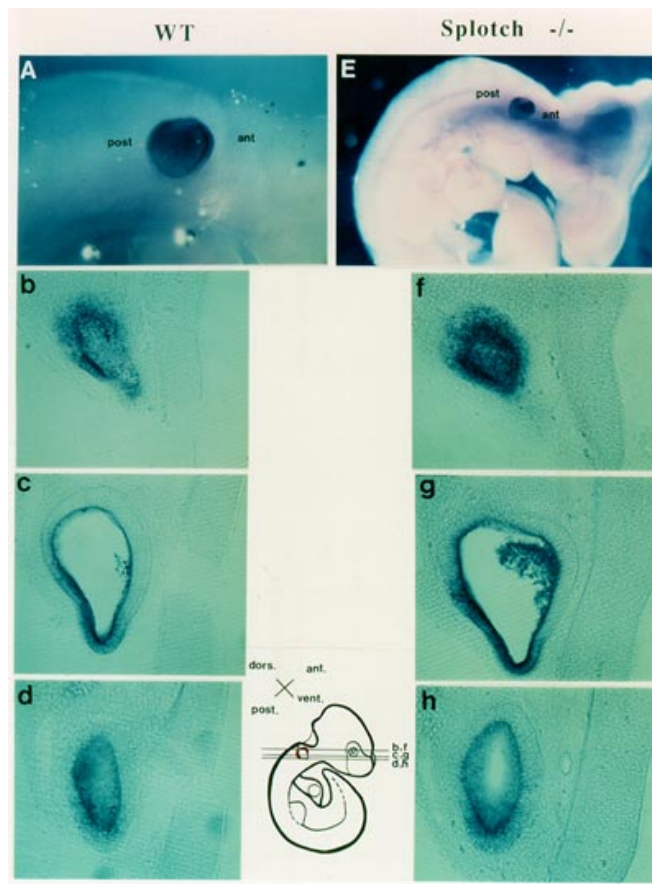


Abb. 21. *Nkx5-1* Expression im invaginierenden Ohrvesikelepithel von E11.5 Embryonen. Gezeigt ist die *Nkx5-1* Transkriptverteilung im erweiterten Ohrvesikel eines *splotch* mutierten Embryos (b) im Vergleich zur Wildtyp Expression im normal verschmälerten Otocysten (a). Die Schnitte führen transversal durch den dorsalen Teil des linken Ohrvesikels der *whole mount* hybridisierten Embryonen. (ant) anterior, (ed) endolymphatischer Gang, (post) posterior.



### 3.2.2.2 Pax-2 Genexpression in *plotch* Embryonen

*Plotch* Embryonen am E10.5 und E11.5 wurden mit einer Digoxigenin-markierten *Pax-2* Probe *whole mount* hybridisiert. *Pax-2* zeigt in der Ohranlage der *plotch* Mutanten kein verändertes Expressionsmuster. Die Transkripte verteilen sich, wie auch in Wildtyp Kontrollembryonen detektiert (siehe Punkt 3.1.1.3, Abb. 12), in der ventralen Hälfte des Otocysten. Hybridisierungssignale sind in der medialen Wand entlang der gesamten anteroposterioren Achse des Vesikels lokalisiert (Daten nicht gezeigt).

Die Abbildung 22 zeigt unveränderte *Pax-2* Expression im *plotch* Embryo im Vergleich zu einem Wildtyp Embryo. Hybridisierungssignale sind zu beiden Seiten der ventrodorsalen Grenze im sich entwickelnden Hinterhirn und Rückenmark über die gesamte rostrocaudale Achse (Nornes et al., 1990) zu detektieren. Die rostrale Expressionsgrenze im Neuralrohr verteilt sich entlang der Mittel-/Hinterhirn Grenze, deutlich zu sehen in Bild 22A. Die Embryonen zeigen weiterhin *Pax-2* Signale im optischen Stiel des Augenbläschens und in der Nierenanlage (Dressler et al., 1990).

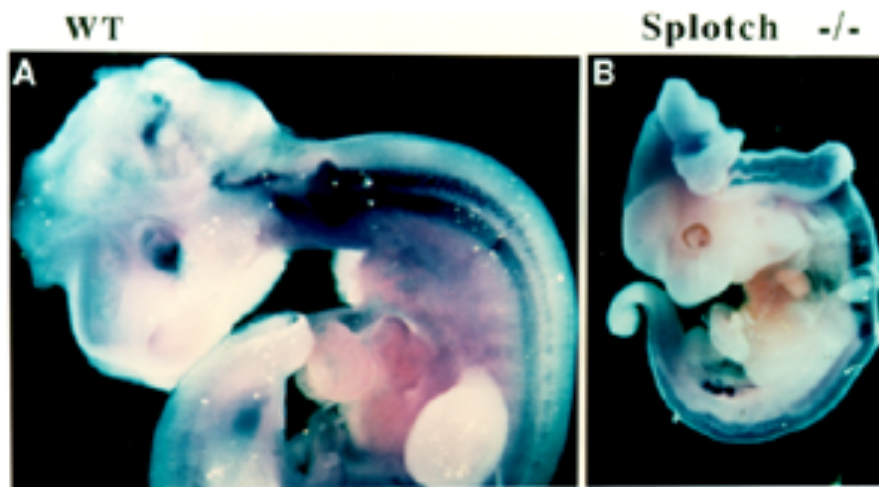


Abb. 22. Unveränderte *Pax-2* Expression im *plotch* Embryo des Stadiums E11.5 (B) im Vergleich zur Wildtyp Expression (A, E10.5 Embryo). Die Embryonen zeigen Hybridisierungssignale im optischen Stiel des Augenbechers, entlang der Mittel-/Hinterhirn-grenze, zu beiden Seiten der dorsoventralen Grenze im sich entwickelnden Hinterhirn und Rückenmark und in der Nierenanlage.

### 3.2.2.3 *Trp-2* Expression in *plotch* Mutanten

In der Region, in der sich die seitlichen Ränder der Neuralplatte zum Neuralrohr schließen, entsteht die Neuralleiste. Ihre Zellen wandern an verschiedene Orte im Embryo und nehmen Teil an der Organbildung. Eine Subpopulation der Neuralleistenzellen sind die Melanoblasten die am Embryonalentwicklungstag 10 die Neuralleiste verlassen und in



verschiedene Regionen, u. a. in die Haut, die Haarfollikel und das Innenohr einwandern. Im Innenohr sind diese Zellen um den vestibulären Apparat und die Cochlea herum lokalisiert, sie konzentrieren sich besonders um den Sacculus und den basalen cochleären Gang (Cable et al., 1995). Im cochleären Gang wandern die Melanoblasten in die Stria vascularis ein.

Für die *plotch* Mutanten wurden viele Unzulänglichkeiten im Rumpfbereich, die auf fehlende Neuralleistenzellen zurückzuführen sind, dokumentiert (Franz, 1989; Moase & Trasler, 1989, 1990). Neuere Daten sprechen dafür, daß die *Pax-3* Funktion auch für die Unversehrtheit von Neuralleisten-Strukturen im Kopfbereich essentiell ist. Gleichsam wird diskutiert, daß das *Pax-3* Gen die Proliferation von Neuralleistenzellen oder ihren Vorläufern reguliert (Tremblay et al., 1995). In *plotch* Mutanten ist bisher nicht untersucht worden, inwieweit die Wanderung von Neuralleistenzellen im cranialen Bereich gestört ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob Melanoblasten aus der prospektiven Neuralleistenregion der *plotch* Embryonen in das sich entwickelnde Innenohr einwandern. Melanoblasten können, bevor sie am E16 in pigmentierte Melanozyten differenzieren, morpho-logisch nicht von anderen mesenchymalen Zellen unterschieden werden. Eine Möglichkeit, die Wanderung von Melanoblasten zu studieren, ist der Nachweis von *Trp-2* Genexpression. Das *Trp-2* Gen codiert für das Enzym DOPochrome Tautomerase (DT), welches DOPochrome in 5,6-Dihydroxyindol Carboxylsäure umwandelt (Tsukamoto et al., 1992) und damit in spätere Stadien der Melaninsynthese involviert ist. Transkripte dieses Gens können schon am Embryonalentwicklungstag 10.0 in Melanoblasten detektiert werden (Steel et al., 1992).

*Plotch* und vergleichsweise Wildtyp Embryonen am E13.5 wurden in Paraffin eingebettet und Gewebeschnitte mit einer Schichtdicke von 10 µm durch den Kopf erstellt. Anschließend wurden ausgewählte Schnitte mit der *Trp-2* Probe *in situ* hybridisiert (*Trp-2* Hybridisierungssprobe siehe Punkt 2.1.6). Die Wildtyp Embryonen zeigten *Trp-2* markierte Melanoblasten im Ektoderm und darunterliegenden Mesenchym, entlang der gesamten Oberfläche in vielen Regionen des Kopfes und um das sich entwickelnde Innenohr herum. Hybridisierungssignale wurden auch in der pigmentierten Retina, die vom lokalen Neuroektoderm stammt und keine Neuralleistenzellen beherbergt, detektiert.

Die Abbildung 23 zeigt repräsentative *Trp-2* Hybridisierungsdaten in Wildtyp Embryonen am E13.5. In 23A und B sind Hybridisierungssignale in der pigmentierten Retina und in wandern-den Melanoblasten im Oberflächenektoderm und darunterliegendem Mesenchym zu sehen. Bild E zeigt *Trp-2* markierte Melanoblasten im cochleären Mesenchym, die um den Ductus cochlearis herum lokalisiert sind. Am E17.5 haben die zu Melanozyten ausdifferenzierten Zellen ihren Zielort, die Stria vascularis im Ductus cochlearis, erreicht (23F,G).

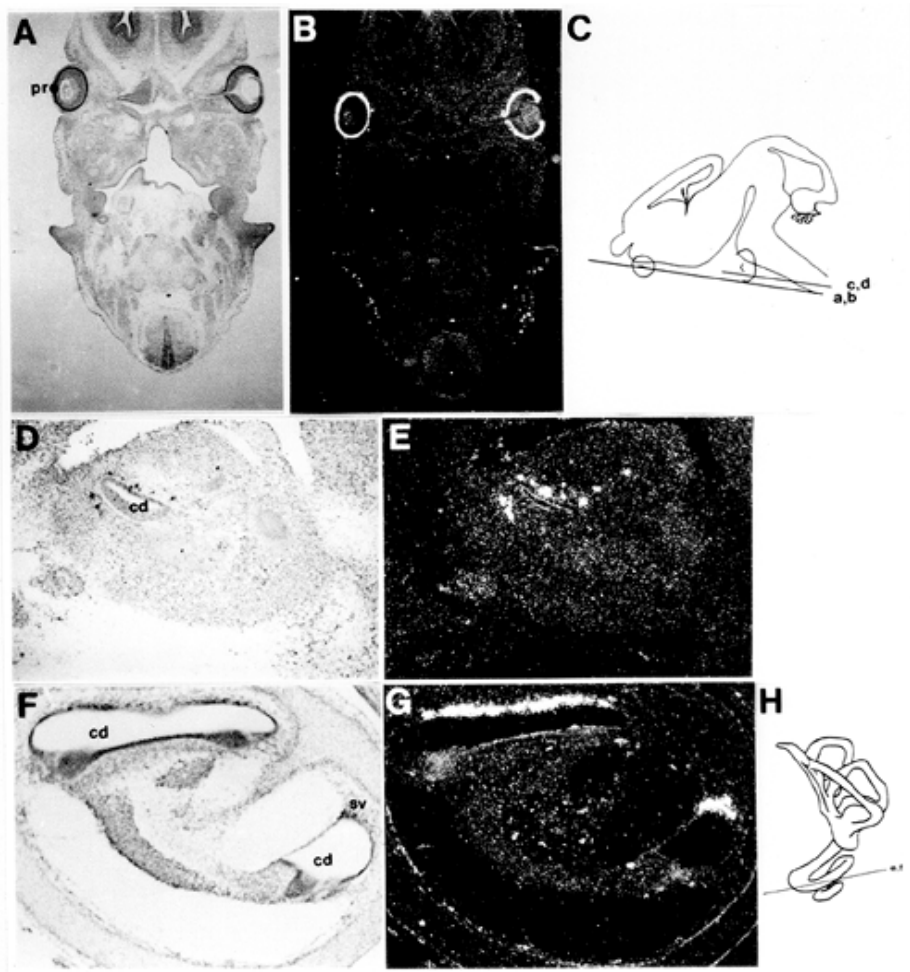


Abb. 23. *Trp-2* Expression im Kopfmesenchym und im Innenohr. In situ Hybridisierungen auf Gewebeschnitten. (A-E) Transversalschnitte durch den Kopf eines E13.5 Embryos in den in C angegebenen Ebenen. (F,G) Transversaler Schnitt durch ein aus E17.5 Embryonen herauspräpariertes Innenohr in der in H angegebenen Ebene. Die Schnitte wurden im Hellfeld (A,D,F) und um Hybridisierungssignale sichtbar zu machen, im Dunkelfeld (B,E,G) fotografiert. B zeigt *Trp-2* Hybridisierungssignale in der pigmentierten Retina und wandernden Melanoblasten in der Dermis und im Mesenchym unterhalb der Haut. E zeigt *Trp-2* markierte Melanoblasten in der Cochlea. (G) *Trp-2* Hybridisierungssignale in Melanozyten, die in die Stria vascularis im cochleären Gang eingewandert sind (Vergleiche hier Abb. 14 und Abb. 17). (cd) Ductus cochlearis, (pre) Pigmentierte Retina, (sv) Stria vascularis.

In *splotch* Embryonen ist, wie durch Hybridisierungen auf frontalen (Daten nicht gezeigt) und transversalen Gewebeschnitten festgestellt wurde, *Trp-2* Genaktivität nur in der pigmentierten Retina nachweisbar. Es wurde keine *Trp-2* Expression im Oberflächenektoderm und darunterliegenden Mesenchym sowie im sich entwickelnden Innenohr detektiert. Die Abbildung 24 zeigt repräsentativ für die *Trp-2* Expression in den *splotch* Mutanten einen zur Abbildung 23A/B vergleichbaren, hybridisierten Gewebeschnitt, der durch die Augen und die Ohrmuschel führt. Hier sind Hybridisierungssignale in der pigmentierten Retina sichtbar, die

Signale im Oberflächenektoderm und Mesenchym, welche wandernde Melanoblasten detektieren, fehlen.

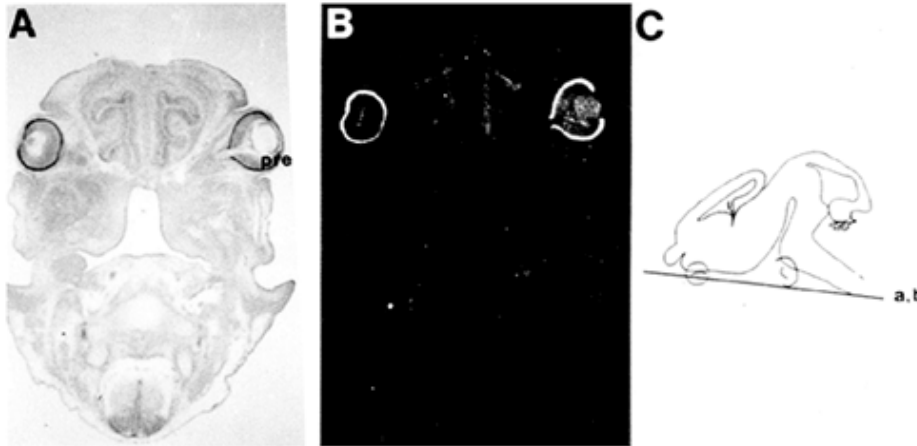
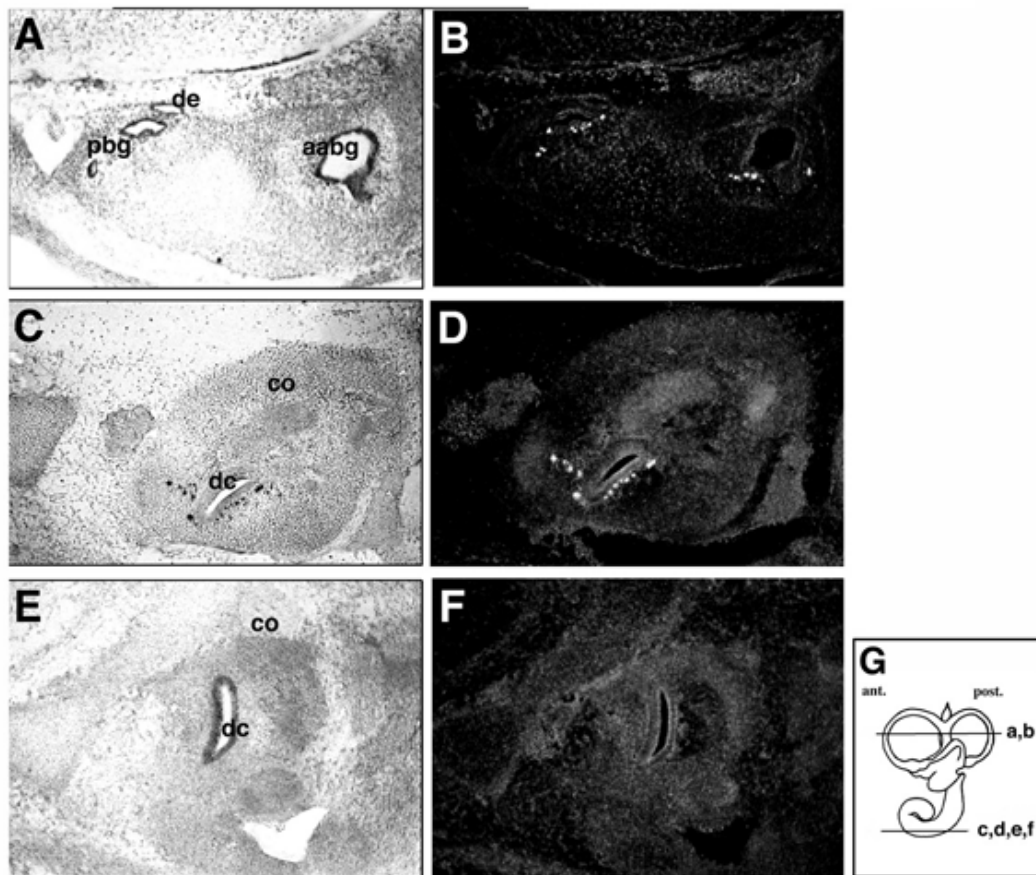


Abb. 24. *Trp-2 in situ* Hybridisierungssignale in *splotch* Embryonen am E13.5. (A) Hellfeldaufnahme des *Trp-2* hybridisierten Gewebeschnitts. B zeigt Hybridisierungssignale in der pigmentierten Retina, die auch deutlich in der Hellfeldaufnahme in A sichtbar sind. Hybridisierungssignale, die wandernde Melanoblasten im Kopfmesenchym und Oberflächen-ektoderm markieren, fehlen. Die Schnittebene ist in C angegeben.

Die Abbildung 25 zeigt vergleichend in hoher Vergrößerung *Trp-2 in situ* Hybridisierungsdaten im sich entwickelnden Innenohr von Wildtyp und *splotch* Embryonen. *Trp-2* markierte Melanoblasten sind im Wildtyp Innenohr um die Bogengänge (25A,B) und den cochleären Gang (25C,D) herum lokalisiert. Es ist deutlich zu sehen, daß auf dem *Trp-2 in situ* hybridisierten Gewebeschnitt durch die Cochlea eines *splotch* Embryos keine Melanoblasten detektiert werden (25E,F). Die fehlende *Trp-2* Expression im vestibulären Teil des Innenohres ist hier nicht gezeigt.

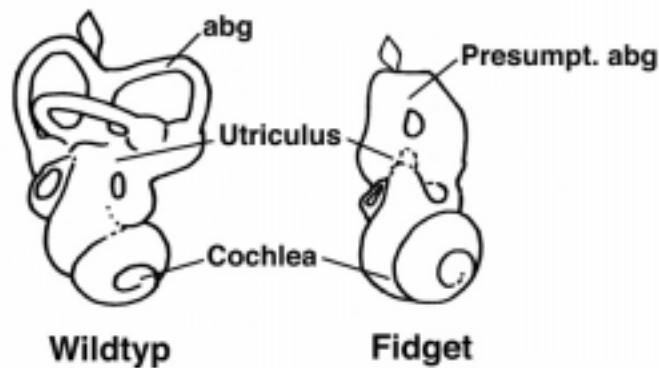
Abb. 25. *Trp-2* Expression im sich entwickelnden Innenohr - im Vergleich Wildtyp (A-D) und *splotch* (E-F) Embryonen des Entwicklungsstadiums E13.5. Gezeigt sind transversale, *Trp-2* hybridisierte Gewebeschnitte. A,C und E sind die zu den Dunkelfeldaufnahmen B,D und F korrespondierenden Hellfeldaufnahmen. B zeigt *Trp-2* Hybridisierungssignale im vestibulären Teil des Innenohres - hier werden Melanoblasten um die Ampulle des anterioren und posterioren Bogenganges herum detektiert. (D) In den Ductus cochlearis einwandernde Melanoblasten im cochleären Mesenchym sind *Trp-2* positiv. F zeigt *Trp-2 in situ* Hybridisierung im *splotch* Embryo. Die Schnittebene ist dieselbe wie in D. Hier können keine *Trp-2* Hybridisierungssignale in der Cochlea detektiert werden. (aabg) Ampulle des anterioren Bogenganges, (co) Cochlea, (dc) Ductus cochlearis, (de) Ductus endolymphaticus, (pbg) Posteriorer Bogengang.



### 3.3 Genexpression in der Innenohr-Mausmutante *fidget*

Die Mutation des *fidget* Gens in der Maus, entdeckt von Grüneberg (1943), verursacht Mißbildungen im vestibulären Teil des Innenohres. Im Innenohr dieser Mausmutante ist das Bogengangsystem auf einen rudimentär angelegten anterioren Kanal reduziert. Die Cristae ampullaris sind, mit Ausnahme der des lateralen Bogenganges, welche nicht vorhanden ist, normal differenziert. Utriculus und Sacculus erscheinen bis auf leichte Formveränderungen, die auf Mißbildungen der knöchernen Ampullen zurückzuführen sind, histologisch normal. Auch in den Maculae werden keine Anomalien detektiert. Die Cochlea und der endolymphatische Gang sind ebenfalls normal entwickelt (Truslove, 1956). Die beschriebenen Innenohrdefekte werden erst mit der Ausformung der speziellen Strukturen sichtbar, der Otocyst weist im Vergleich zum Wildtyp noch keine Veränderungen auf.

**Abb. 26.** Schematische Darstellung der Innenohrmißbildungen in *fidget* Mausmutanten im Vergleich zu einem Wildtyp Innenohr. Gezeigt wird das auf einen **presumptiven anterioren Bogengang** reduzierte Bogengangsystem. (abg) Anteriorer Bogengang, (Presumpt. abg) Presumptiver anteriorer Bogengang.



Zur Untersuchung der Expressionsmuster innenohrspezifischer Gene, die in der Anlage des vestibulären Apparates Aktivität aufweisen, ist durch Verpaarung eines homozygoten *fidget* Männchen (siehe Punkt 2.1.8) mit C57 Wildtyp Weibchen ein Mausstamm etabliert worden. Embryonen für die Expressionsanalysen wurden aus homozygoten *fidget* Verpaarungen erhalten. Die Fertilität der homozygoten *fidget* Weibchen ist herabgesetzt, so daß nur 70% der Verpaarungen erfolgreich waren.

### 3.3.1 *Nkx5* Genexpression im Innenohr von *fidget* Mutanten

Das *Nkx5-1* Gen zeigt eine spezifische Expression in der Anlage des vestibulären Apparates und ist, wie kürzlich durch die gezielte Inaktivierung dieses Gens *in vivo* („Knock-out“ Experiment), gezeigt wurde, essentiell für die Ausbildung der Bogengänge und deren Ampullen (Hadrys, 1998). *Nkx5-2*, angeschaltet am E14, wird zum *Nkx5-1* Gen identisch im differenzierenden vestibulären Apparat exprimiert. Da beide Gene in den Strukturen aktiviert werden, die im Innenohr von *fidget* Mäusen mißgebildet sind, war eine Überprüfung dieser Gene in den Mutanten von Interesse.

Die *Nkx5-1* Genaktivität in der Ohranlage wurde mittels *whole mount* Hybridisierungen in E10.5 Embryonen untersucht. Für die Analyse eines späteren Entwicklungsstadiums wurden E14.5 Innenohren isoliert, in Paraffin eingebettet und Gewebeschnitte mit einer Schichtdicke von 5 µm erstellt und *in situ* hybridisiert. In diesem Stadium wurde zusätzlich die *Nkx5-2* Expression überprüft.

Die Hybridisierungsdaten zeigten eine generell unveränderte Expression der *Nkx5-1* und *Nkx5-2* Gene im sich entwickelnden Innenohr der *fidget* Mutanten an.

In Abbildung 27 sind *Nkx5-1* *whole mount* hybridisierte Wildtyp und *fidget* Embryonen zu sehen. Vibratonschnitte führen transversal durch die Otocystenregion der hybridisierten Embryonen und zeigen die *Nkx5-1* Expression im dorsolateralen Vesikelepithel.

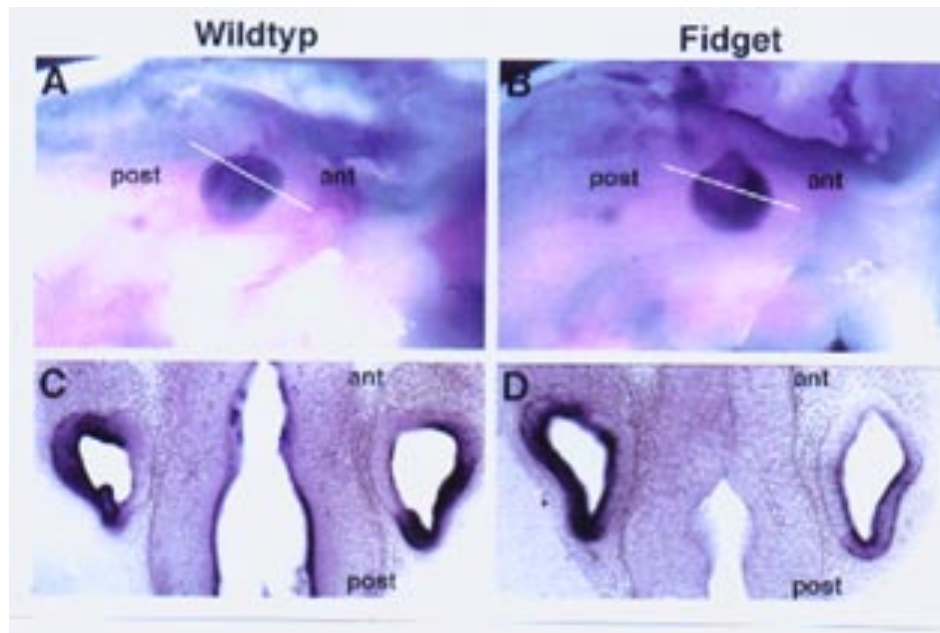
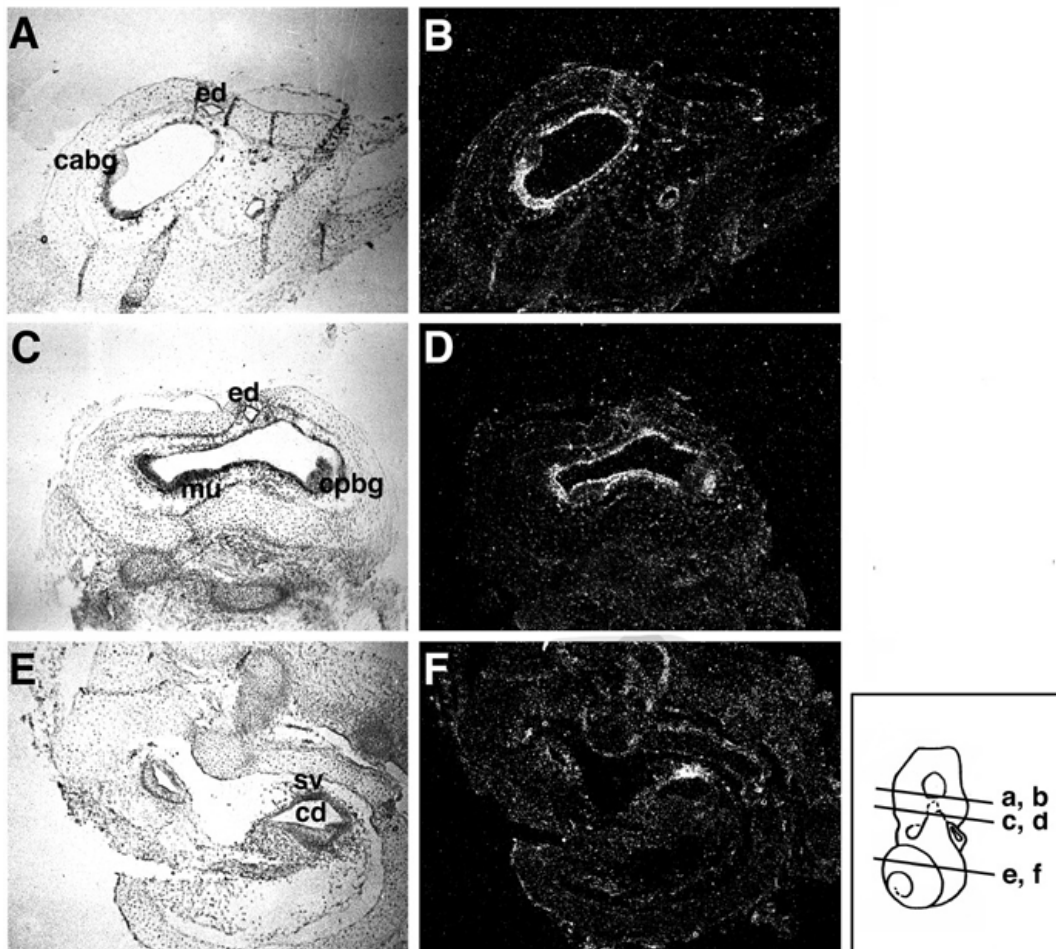


Abb. 27. *Nkx5-1* Expression gezeigt in *whole mount* hybridisierten *fidget* (B) und wildtyp (A) Embryonen am E10.5. Die Hybridisierungssignale im Otocysten eines *fidget* Embryos (B) zeigen dieselbe *Nkx5-1* Transkriptverteilung wie im Otocysten von Wildtyp Embryonen (A) an. Die transversalen Vibratomschnitte (siehe die durch den Ohrvesikel gelegten Schnittebenen) zeigen identische *Nkx5-1* Expression in Wildtyp (C) und *fidget* (D) Embryonen. (ant) anterior, (post) posterior.

Im differenzierenden Innenohr, am E14.5, wurde *Nkx5-1* und *Nkx5-2* Expression ebenfalls entsprechend der Wildtypsituation in den nicht-sensorischen Epithelien des vestibulären Apparates detektiert.

Die Abbildung 28 zeigt die *Nkx5-1* und *Nkx5-2* Transkriptverteilung im Innenohr von *fidget* Embryonen. *In situ* Hybridisierungssignale sind im Rudiment des anterioren Bogenganges (28B), im Utriculus und der presumptiven Ampulle des posterioren Bogenganges (28D) zu sehen. Die sensorischen Regionen, die anteriore und posteriore Crista ampullaris sowie die Macula utriculi, weisen keine *Nkx5* Genaktivität auf (28B,D). Die Cochlea, in *fidget* Mutanten normal ausgebildet, zeigt unveränderte *Nkx5* Genexpression in der Stria vascularis (28F). Der endolymphatische Gang weist entsprechend der Wildtypsituation keine *Nkx5* Genaktivität auf (28B,D).

Abb. 28. *Nkx5-1* und *Nkx5-2 in situ* Hybridisierungen auf transversalen Gewebeschnitten durch ein E14.5 *fidget* Innenohr. A,C und E sind die Hellfeldaufnahmen zu den in B,D und F gezeigten Dunkelfeldaufnahmen. (B) *Nkx5* Genexpression im nicht-sensorischen Epithel der stark erweiterten Ampulle des rudimentären anterioren Bogenganges. Die Crista weist keine Expression auf. D zeigt *Nkx5* Gentranskripte im Epithel des Utriculus und der stark erweiterten ampullären Region des rudimentären posterioren Bogenganges an. Die sensorischen Regionen, die Macula utriculi und die posteriore Crista sind frei von Hybridisierungssignalen. F zeigt *Nkx5* Genexpression in der Stria vascularis der normal ausgebildeten Cochlea an. (cabg) Crista des anterioreren Bogenganges, (cd) Cochleärer Gang, (cpbg) Crista des posterioreren Bogenganges, (ed) endolymphatischer Gang, (mu) Macula utriculi (sv) Stria vascularis



### 3.3.2 *Msx-1* Expression im Innenohr von *fidget* Mutanten

*Msx-1*, ehemals als *Hox-7.1* kloniert, ist ein hochkonserviertes Homeoboxgen, das für einen Transkriptionsfaktor codiert und im Mausembryo ab E9.5 ein breites Expressionsmuster zeigt (Hill et al., 1989). Im sich entwickelnden Innenohr wird es im dorsalen, ersten Drittel der Ohranlage, die Ursprung für die Bogengänge gibt, exprimiert. Diese spezifische Genaktivität wurde bisher nur in Hühnchenembryonen untersucht (Suzuki et al., 1991; Wu & Oh, 1996). Wu beschreibt *Msx-1* Expression in den Anlagen der Cristae ampullaris, in einigen Regionen der Bogengänge und im endolymphatischen Gang. Die genaue Verteilung von *Msx-1* Transkripten in einzelnen Strukturen des sich entwickelnden Innenohrs der Maus ist bisher nicht untersucht worden.

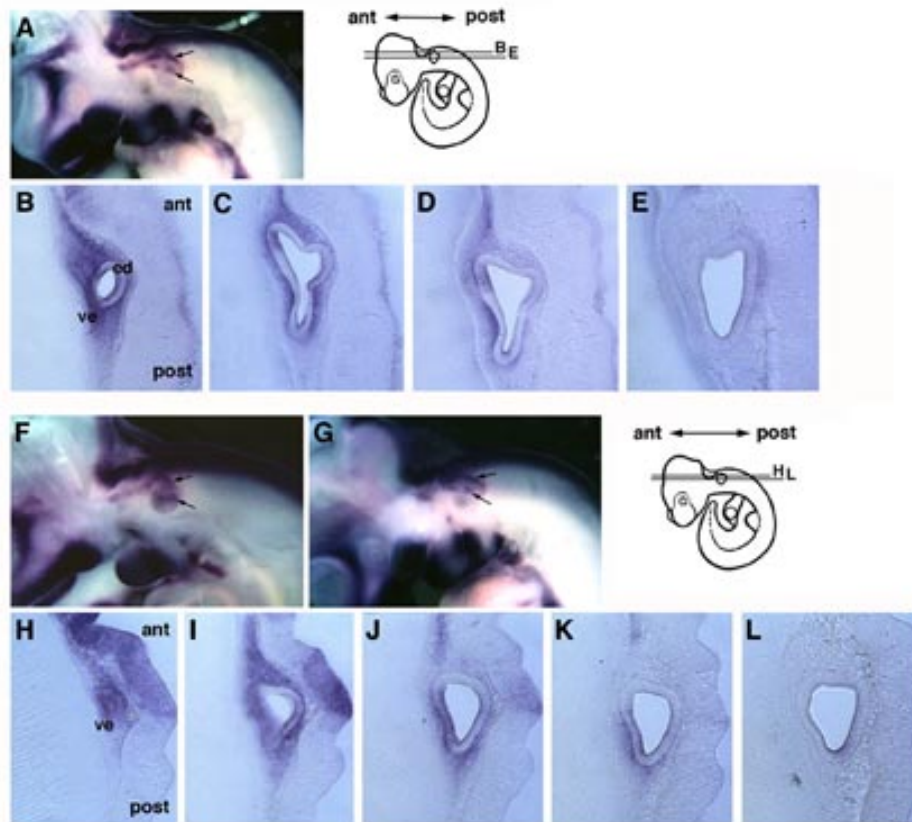
Im Rahmen der Genexpressionsstudien im sich entwickelnden Innenohr, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurden, zeigte sich, daß *Msx-1* nicht nur im Ohrvesikelepithel sondern auch im umgebenden Mesenchym exprimiert wird. Die Mißbildungen im vestibulären

Apparat des Innenohres der *fidget* Mutante, die Störungen bei den epithelialen/mesenchymalen Bewegungen der Ohranlage zur Ausbildung der Bogengänge anzeigen, ließen eine mögliche Veränderung der Aktivität des *Msx-1* Gens vermuten. Um diesen Sachverhalt abzuklären, wurden E10.0 bzw. E10.5 Wildtyp und *fidget* Embryonen *Msx-1 whole mount* hybridisiert (Hybridisierungsprobe siehe Punkt 2.1.6) und die Transkriptverteilung in der Ohranlage untersucht. Zusätzlich wurde die *Msx-1* Expression im differenzierteren E14.5 Innenohr von Wildtyp und *fidget* Embryonen überprüft.

Die Analysen ergaben, daß das *Msx-1* Gen in den *fidget* Mutanten unverändert exprimiert wird. In der Abbildung 29 ist eine Auswahl an Hybridisierungsdaten in E10.5 (E10.0) Embryonen zusammengestellt. Die *whole mount* hybridisierten Wildtyp (29A) und *fidget* (29F,G) Embryonen zeigen *Msx-1* Expression in der dorsalen Hälfte des Ohrvesikels und umgebendem Mesenchym (siehe Pfeile). Auf den in 29B-E (Wildtyp) und 29H-L (*fidget*) gezeigten Vibratomschnitten durch die gefärbten Embryonen ist die Verteilung der *Msx-1* Transkripte detaillierter zu sehen. In den Wildtyp Embryonen zeigt das Epithel am dorsalen Pol des Otocysten, einschließlich der Anlage des endolymphatischen Ganges *Msx-1* Expression (29B). Zur Mitte des Otocysten hin ist die Genaktivität auf die presumptiven sensorischen Regionen reduziert, aus denen sich die Cristae ampullaris entwickeln (29C,D). Eine starke *Msx-1* Expression zeigt das den dorsalen Otocysten umgebende Mesenchym (29B), diese Domäne wird im zweiten Drittel der Ohranlage schmaler (29C,D). Im ventralen Teil des sich entwickelnden Innenohres wird keine *Msx-1* Genaktivität detektiert. Dieses Expressionsmuster deckt sich mit den in 29F-L vergleichend gezeigten Hybridisierungsdaten in *fidget* Embryonen. Die *Msx-1* Expression in den *fidget* Mutanten ist hier anhand von zwei verschiedenen Embryonalentwicklungsstadien (E10.0 in F und E10.5 in G) illustriert. Die Vibratomschnitte in 29H-L führen durch die Otocystenregion des E10.0 Embryos und zeigen sehr deutlich *Msx-1* Hybridisierungssignale im dorsolateralen Vesikelepithel und umgebendem Mesenchym. Die Anlagen der Cristae sind in diesem Stadium noch nicht spezifisch markiert. Der in 29G abgebildete E10.5 *fidget* Embryo weist eine mit dem in A gezeigten Wildtyp Embryo direkt vergleichbare *Msx-1* Expression auf. Hier sind unter anderem deutliche Hybridisierungssignale in zwei Regionen im lateralen Vesikelepithel, die die Anlagen der Cristae darstellen, zu sehen (siehe Pfeile).

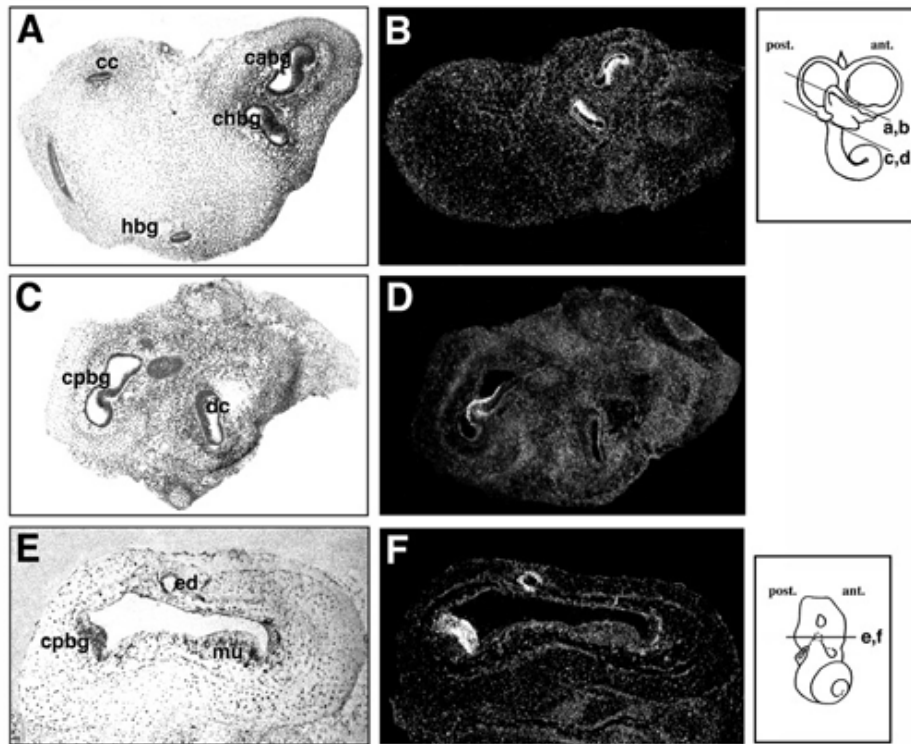
**Abb. 29. *Msx-1* Expression im Otocysten von *fidget* Mutanten im Vergleich zur Wildtyp Expression.** Dargestellt sind *whole mount* hybridisierte E10./E10.5 Embryonen und Vibratomschnitte, die die *Msx-1* Expression im linken Ohrvesikel und umgebenden Mesenchym zeigen. (A) *Msx-1* hybridisierter E10.5 Wildtyp Embryo. Hybridisierungssignale sind am dorsalen Pol des Otocysten und in zwei Regionen, aus denen sich die Crista entwickeln, zu sehen (siehe Pfeile). (B-E) Transversal durch den Ohrvesikel eines Wildtyp Embryos geführte Vibratomschnitte, die die Transkriptverteilung des *Msx-1* Gens in der dorsalen Hälfte des Ohrvesikels und im angrenzenden Mesenchym zeigen. Die Schnittebenen sind daneben schematisch angegeben. (F) E10.0 *fidget* Embryo. (G) E10.5 *fidget* Embryo, der eine zum Wildtyp Embryo (A) identische *Msx-1* Expression zeigt (siehe Pfeile). (H-L) Vibratomschnitte durch einen E10.0 *fidget* Embryo in den schematisch angegebenen Ebenen. (ant) anterior, (ed) endolymphatischer Gang, (post) posterior, (ve) Vesikelepithel.





Die Abbildung 30 zeigt *Msx-1* *in situ* hybridisierte, 5 µm dicke Gewebeschnitte von isolierten, in Paraffin eingebetteten E14.5 Innenohren. In diesem Entwicklungsstadium ist die *Msx-1* Genaktivität im sich entwickelnden Innenohr auf die Sinneseithelien der Bogengänge, die Cristae ampullaris und den endolymphatischen Gang begrenzt. Die *Msx-1* Expression in der anterioren, lateralen und posterioren Crista ampullaris ist in den Bildern 30A-D zu sehen. Vergleichend werden in 30F *Msx-1* Hybridisierungssignale in der posterioren Crista ampullaris und im endolymphatischen Gang eines Innenohrs von *fidget* Embryonen gezeigt, die repräsentativ für die unveränderte Expression dieses Gens in den Mutanten sind.

**Abb. 30. *Msx-1* *in situ* Hybridisierungen auf transversalen Gewebeschnitten von E14.5 *fidget* (E und F) und Wildtyp (A-D) Innenohren.** A,C und E sind die Hellfeldaufnahmen, die zu den in B,D und F gezeigten Dunkelfeldaufnahmen korrespondieren. Die Schnittebenen sind in den nebenstehenden Schemata angegeben. B und D zeigen *Msx-1* Hybridisierungssignale in den Sinneseithelien der Bogengänge (anteriore, laterale und posteriore Crista ampullaris) von Wildtyp Embryonen. F zeigt normale *Msx-1* Expression in Innenohren von *fidget* Mutanten. Hier sind Hybridisierungssignale in der Crista des posterioren Bogenganges und im endolymphatischen Gang zu sehen. (cabg) Crista des anterioren Bogenganges, (chbg) Crista des horizontalen bzw. lateralen Bogenganges, (cpbg) Crista des posterioren Bogenganges, (dc) Ductus cochlearis, (de) Ductus endolymphaticus, (hbg) horizontaler bzw. lateraler Bogengang.



### 3.3.3 Expression des Fibroblasten Wachstumsfaktor Rezeptor 2 (*FGFR2*) Gens im *fidget* Innenohr

Fibroblasten Wachstumsfaktor Rezeptoren werden in verschiedenen Isoformen an vielen Orten im Embryo exprimiert (Givol & Yayon, 1992). Sie binden die Fibroblasten Wachstumsfaktoren (FGFs) und initiieren dadurch Signalkaskaden. Der *FGFR2* Genlocus bringt zwei alternative Spliceprodukte hervor, *KFR2* und *bek*, die jeweils unterschiedliche Rezeptoren mit individueller Ligandenspezifität ausbilden (Miki et al., 1992). *KFR2* und *bek* werden während der Gastrulation annähernd ubiquitär exprimiert, zeigen jedoch während der Organogenese deutlich unterschiedliche, spezifische Expression, unter anderem auch in der Cochlea und dem vestibulären Apparat des sich entwickelnden Innenohres (Orr-Urtreger et al., 1993).

Hier wurde die Verteilung der Rezeptorvariante *bek*, die selektiv FGF2 bindet, in der Ohranlage von Wildtyp und *fidget* Embryonen am E10.5 untersucht. Es sollte geklärt werden, ob die Aktivität des *FGFR2* Gens in den *fidget* Mutanten gestört ist. Für die Hybridisierung der Embryonen wurde Digoxigenin-markierte Antisense-RNA vom *FGFR2* Klon *bek* (siehe Punkt 2.1.6) transkribiert.

Die Hybridisierungsdaten zeigten, daß das *FGFR2* Gen im Otocysten von Wildtyp (Abb. 31A) und *fidget* Embryonen (Abb. 29B) identisch exprimiert wird. Die Pfeile in der

Abbildung 31A/C kennzeichnen eine dorsale und eine ventrale Expressionsdomäne im Vesikelepithel. Die *FGFR2* Transkriptverteilung im Otocysten ist auf den Vibratonschnitten durch die hybridisierten Wildtyp (31D-F) und *fidget* Embryonen (31G-I) zu sehen. Der dorsale Pol des Ohrvesikels zeigt Expression im lateralen und posterioren sowie in dem dem Hinterhirn zugewandten Epithel. Die anteriore Wand sowie die Anlage des endolymphatischen Ganges sind frei von Hybridisierungssignalen (31D,G). In der Mitte des Otocysten werden *FGFR2* Signale in der lateralen und medialen Wand des Otocysten detektiert (31E,H). Die *FGFR2* exprimierenden Regionen sind in die Bildung der Bogengänge involviert. In der ventralen Hälfte des Ohrvesikels, der Anlage der Cochlea, zeigt das *FGFR2* Gen Expression im posterioren Epithel (31F,I).

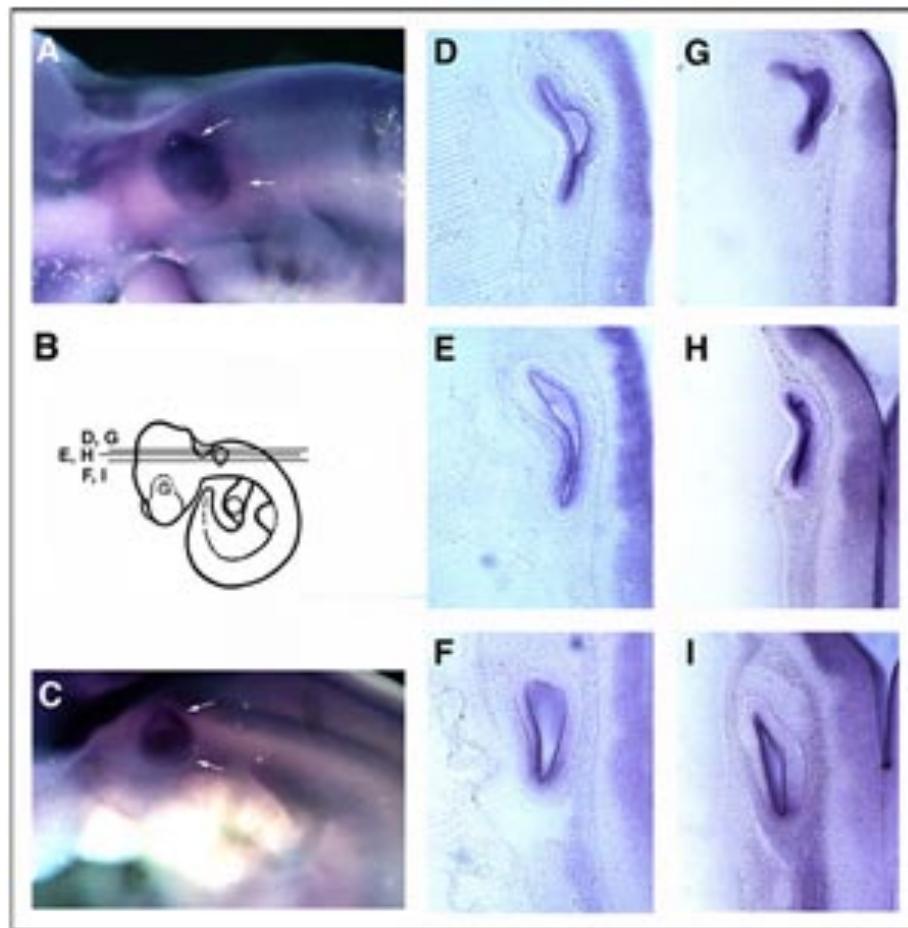


Abb. 31. *FGFR2* Expression in Wildtyp (A) und *fidget* Embryonen (C). Gezeigt sind *whole mount* hybridisierte E10.5 und Vibratonschnitte, die in den schematisch angezeigten Schnittebenen transversal durch den gefärbten Otocysten führen. D-F zeigen die *FGFR2* Transkriptverteilung im Ohrvesikel von Wildtyp Embryonen. Vergleichend ist in G-I die Transkriptverteilung in *fidget* Mutanten gegenübergestellt. Es ist jeweils der linke Ohrvesikel gezeigt, wobei der anteriore Pol oben im Bild lokalisiert ist. Die Pfeile in A und C markieren die dorsale und die ventrale Expressionsdomäne von *FGFR2* im Otocysten, die in *fidget* Mutanten unverändert vorhanden sind.

### 3.4 Untersuchung der Innenohrmorphogenese *in vitro* Kultursystem

Die *in vitro* Kultivierung von sich entwickelnden Innenohren stellt ein die *in vivo* Bedingungen simulierendes Modellsystem dar, das durch biochemische Modifikation oder die Beeinflussung der Aktivität spezieller Gene, die Untersuchung der Funktion von Genen möglich macht.

Differenzierungsprozesse im sich *in vitro* entwickelnden Innenohr können durch Zugabe von Morphogenen/Mitogenen (Represa & Bernd, 1989; Nieto et al., 1991; Frenz et al., 1992) oder durch die selektive Veränderung von Genexpression (Überexpression mittels viraler Konstrukte und Blockierung der Translation durch Antisense-Oligonukleotide, die entweder zum Kulturmedium gegeben oder in das Gewebe lokal injiziert werden) gezielt manipuliert werden (Kiernan & Fekete, 1997; Foerst-Potts & Sadler, 1997; Srivastava et al., 1995; Qin & Kirby, 1995). In einer histologischen und molekularbiologischen Analyse der veränderten Innenohrepithelien kann die Funktion einzelner Gene geklärt werden.

Auf der Basis der Experimente der Arbeitsgruppe Van De Water (Van De Water & Ruben, 1974; Li et al., 1978; Anniko et al., 1979) wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Organkultursystem optimiert und untersucht, ob Gene in den *in vitro* kultivierten Innenohren spezifisch exprimiert werden. Innenohrepithelien wurden aus Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien (E12.5-E14.5) herauspräpariert und zur morphologischen und molekularbiologischen Auswertung bis zum Entwicklungstag 18.5 kultiviert. Dieses Stadium ist, aufgrund einer Wachstumsverzögerung *in vitro*, dem E17.5 *in vivo* äquivalent (Anniko et al., 1979). Am E17.5 sind alle Strukturen angelegt und die Gene, die an den Differenzierungsprozessen im Innenohr beteiligt sind (siehe auch Punkt 3.1.2.2), sind noch aktiv.

Die Gewebepräparation erfolgte wie im Kapitel Material und Methoden unter Punkt 2.2.12 beschrieben.

#### 3.4.1 *In vitro* Kultivierung von Otocysten aus E12.5 und E13.5 Mausembryonen

Die Morphogenese des vestibulären Apparates und der Cochlea beginnen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung (Sher, 1971). Um Prozesse, die zur Ausformung der vestibulären Strukturen führen, *in vitro* untersuchen zu können, wurde die Kultivierung von E12.5 Otocysten optimiert. Zur Untersuchung von Differenzierungsprozessen im Epithel des cochleären Ganges wurden darüber hinaus auch E13.5 Otocysten kultiviert. Für die Ausbildung der Cochlea, aber insbesondere für die Differenzierungsvorgänge im cochleären Epithel, ist es günstiger, die Otocysten zur Kultivierung in einem fortgeschritteneren Entwicklungsstadium, am E13.5, zu entnehmen, da zu diesem Zeitpunkt Zelldifferenzierungsprozesse bereits initiiert sind

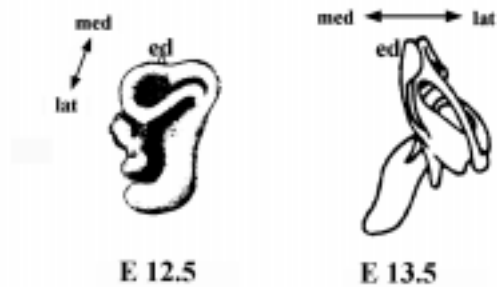


Abb. 32. Schematische Darstellung der Otocysten am E12.5 und E13.5 (aus: Hinrichsen, 1990)

Die Abbildung 32 zeigt den Entwicklungsstand beider Otocystengruppen. Am E12.5 beginnt das Epithel damit sich für die Ausbildung der Bogengänge einzustülpen und aufzufalten. Es gibt keine definierte utriculosacculäre Region und ein haakenförmiger Schlauch wächst als Ansatz der Cochlea nach ventral aus. Otocysten des Entwicklungsstadiums E13.5 haben drei ausgebildete Bogengänge und einen utriculosacculären Hohlraum. Die Cochlea hat eineinviertel Windungen und zeigt noch keine Anzeichen von Differenzierung.

#### 3.4.1.1 Optimierung der Kultivierungsbedingungen

Die Kulturbedingungen für die Innenohren wurden in mehreren Versuchsreihen, auf der Basis verschiedener Protokolle (Kelley & Corwin, 1993; Van De Water, 1973; Anniko et al., 1979; Li et al., 1978), optimiert. Diese Protokolle unterschieden sich in der Zusammensetzung des Kulturmediums, als Inkubationstemperatur war einheitlich 34.5°C - 35.1°C angegeben.

Zunächst wurde die Innenohr-*in vitro* Kultivierung in DMEM-Kulturmedium, unter Zusatz von 10% Mausembryoextrakt und 20% FCS, in Cell Tak beschichteten Zellkulturschalen durchgeführt. Unter diesen Versuchsbedingungen entwickelten sich die Otocysten nicht. In speziellen Organkulturschalen (siehe Abb. 5), welche einen besseren Gasaustausch ermöglichen, proliferierte das Ohrvesikelepithel, jedoch wiesen diese Gewebe keine Morphogenese auf. Unter Verwendung des N&T Kulturmediums anstatt DMEM, ohne die Zugabe von Mausembryoextrakt, entwickelte sich ein großer Teil der kultivierten Otocysten. Es zeigte sich jedoch, daß in diesen Kulturen die Differenzierungsprozesse und die Morphogenese, durch die mit 20% zu hohe Serumkonzentration, gehemmt wurde. In N&T Kulturmedium mit einem FCS-Anteil von 10% entwickelten die *in vitro* Innenohren eine mit den *in vivo* Innenohren vergleichbare Morphologie und die Anlagen der Sinnesepithelien wiesen Differenzierung auf (siehe Punkt 3.4.1.2). Die im folgenden beschriebenen *in vitro* Daten stammen aus der Analyse von Innenohren, die unter den optimierten Bedingungen, wie sie unter Punkt 2.2.13.2/3 dargestellt sind, kultiviert wurden.

### 3.4.1.2 Die Morphologie der *in vitro* kultivierten Innenohren

Die morphologischen Veränderungen der *in vitro* kultivierten Innenohren sind während der Zeit ihrer Inkubation mikroskopisch kontrolliert worden. Nach sechs (E12.5 Otocysten) bzw. fünf (E13.5 Otocysten) Tagen wurden die Kulturen mit PBS abgestoppt, fixiert und histologisch ausgewertet. Die Innenohren wurden einzeln in Paraffin eingebettet (siehe Punkt 2.2.9) und 5 µm dicke Gewebeschnitte Hämatoxylin/Eosin gefärbt (siehe Punkt 2.2.10).

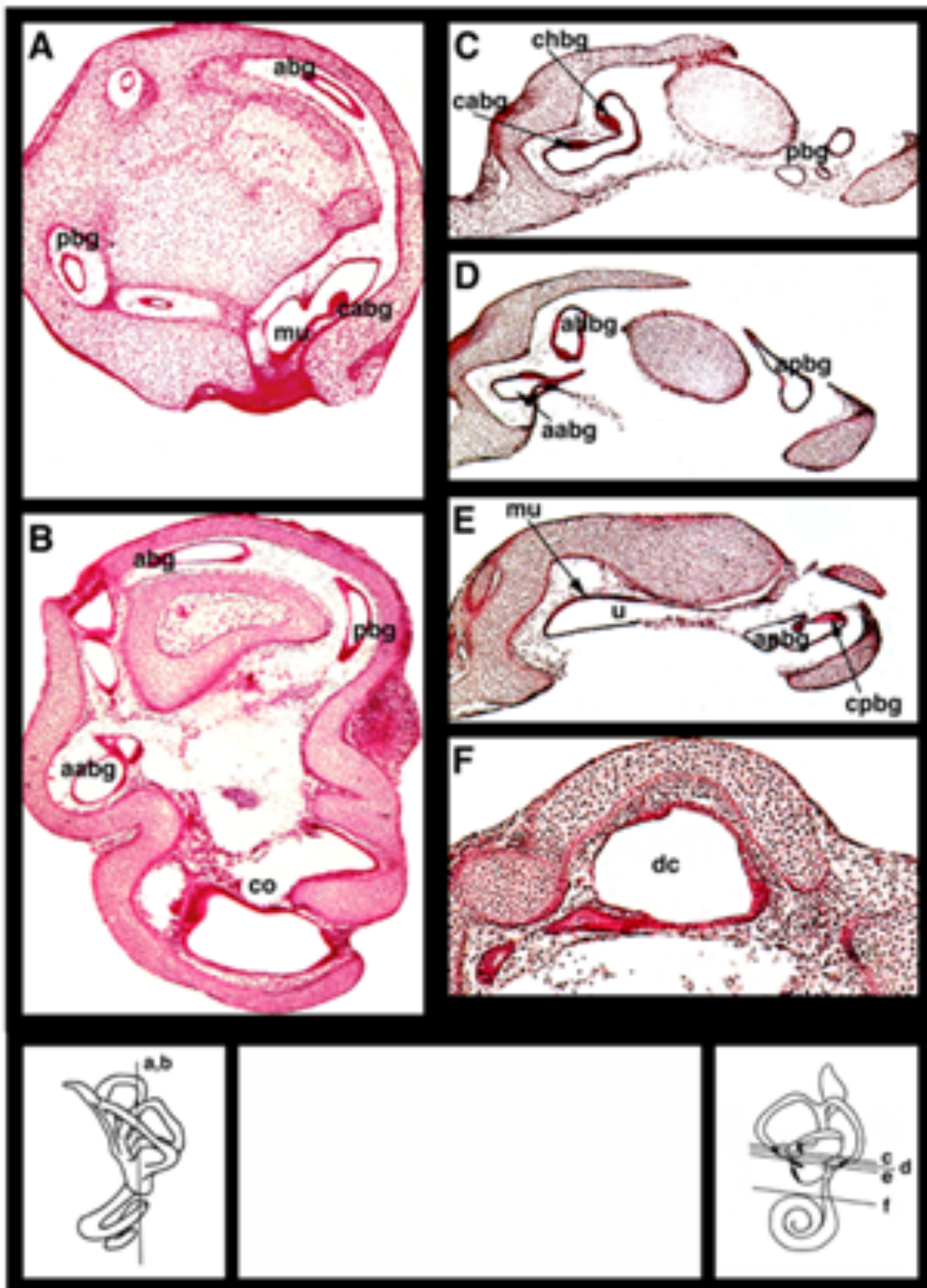
Das *in vitro* kultivierte Innenohr bildet zwei Bogengänge, den anterioren und den posterioren, die in der Crus commune vereinigt sind und einen lateralen Bogengang (Daten nicht gezeigt). An der Basis der Kanäle finden "ampulläre Schwellungen" statt und es entwickeln sich die Ampullen, die die Sinnesepithelien beherbergen. Das zentrale Lumen des Innenohres bildet einen Utriculus und einen Sacculus aus, auch ein endolymphatischer Gang ist vorhanden.

Bezüglich der Morphologie der ausgebildeten Strukturen in den kultivierten Innenohren liegt eine große Variabilität vor, die auch von Van De Water beobachtet wurde (persönliche Mitteilung). Die Hohlräume sind teilweise stark erweitert und deformiert. Immer ist ein weiter perilymphatischer Raum vorhanden, der die Bogengänge und den Utriculus umgibt. Die Knochenkapsel ist gut ausgebildet, allerdings weist auch sie Deformierungen auf. Da bei den Otocystenpräparationen immer ein Teil des umgebenden Mesenchyms entfernt wird, kann es vorkommen, daß in einigen Regionen des *in vitro* kultivierten Innenohres das Knochengewebe fehlt (zu sehen in Abb. 33C). Die histologische Auswertung der Organkulturen hat weiterhin gezeigt, das eindeutig differenzierte sensorische Epithelien im vestibulären Apparat vorhanden und korrekt lokalisiert sind.

Die Cochlea der kultivierten Innenohren wies ebenfalls eine variable Morphologie, hier bezüglich der Anzahl der Windungen und der Weite des Lumens des cochleären Ganges, auf. In E13.5 Explanten zeigte die Cochlea im allgemeinen eineinviertel Windungen. Der Differenzierungsgrad des cochleären Epithels war, unter Berücksichtigung der Entwicklungsverzögerung *in vitro*, annähernd mit der Cochlea *in vivo* vergleichbar. In am E12.5 präparierten Otocysten war die Cochlea nicht in allen *in vitro* kultivierten Innenohren ausgebildet (siehe Abb. 33A) und wenn sie vorhanden war, zeigte sie vergleichsweise weniger differenzierte Strukturen. Schon Van De Water (1974) hat eine zeitliche Verzögerung der Differenzierungsprozesse in *in vitro* kultivierten Otocysten, die aus jüngeren Mausembryonen isoliert wurden, beschrieben. In Organkulturen, die von E13.5 Otocysten angelegt wurden, war nach fünf Tagen Inkubation die Anlage des Cortischen Organs mikroskopisch sichtbar, auch die Stria vascularis konnte identifiziert werden. Insgesamt zeigt die *in vitro* kultivierte Cochlea eine Morphologie, die mit der Morphologie *in vivo* nur in den Ansätzen vergleichbar ist, wobei die Differenzierungsprozesse im cochleären Epithel durchaus stattfinden.

Die Abbildung 33 zeigt Hämatoxylin-Eosin gefärbte Gewebeschnitte, die die Morphologie der *in vitro* kultivierten Innenohren illustrieren





**Abb. 33** H/E-gefärbte Schnitte durch *in vitro* kultivierte Innenohren, die dem E17.5 äquivalent sind. A und B zeigen sagittale Gewebeschnitte durch 6 bzw. 5 Tage kultivierte E12.5 (A) und E13.5 (B) Otocysten - die Schnittebene ist darunter angegeben. In C-F sind transversale Gewebeschnitte in den im rechten Schema angegebenen Ebenen durch einen kultivierten E13.5 Otocysten von dorsal nach ventral zu sehen. (abg) Anteriorer Bogengang, (aabg, ahbg, apbg) Ampulle des anterioren, lateralen bzw. horizontalen und posterioren Bogenganges, (cabg, chbg, cpbg) anteriore, laterale und posteriore Crista ampullaris, (co) Cochlea, (dc) Ductus cochlearis, (mu) Macula utriculi, (pbg) Posteriorer Bogengang, (u) Utriculus.

#### 3.4.1.3 In *in vitro* kultivierten Innenohren ist spezifische Genaktivität nachweisbar

Das Innenohr-Organkultursystem wurde für molekularbiologische Studien etabliert, in dem die Funktion innenohrspezifischer Gene untersucht werden soll.

Die Funktionsstudien basieren auf der Möglichkeit die Innenohrentwicklung *in vitro* zu modifizieren. Um Veränderungen der Aktivität von Genen detektieren zu können, die in die Prozesse, wie sie in dem Kultursystem modifiziert werden, involviert sind, muß die Genexpression in den kultivierten Geweben nachgewiesen werden können. Zudem muß gewährleistet sein, daß die Genexpression *in vitro* mit der *in vivo* Situation identisch ist.

Exemplarisch wurden die Expressionsmuster der Gene *Nkx5-1*, *Nkx5-2*, *sek* und *Trp-2* in *in vitro* kultivierten Innenohren bestimmt und mit den *in vivo* Expressionsdaten verglichen. Hierfür wurden Innenohren, die sich aus E12.5 und E13.5 Explanten entwickelten, in Paraffin eingebettet und 5 µm dicke Paraffinschnitte mit radioaktiven Antisense-RNA Transkripten *in situ* hybridisiert. Die untersuchten Gene wiesen in den *in vitro* kultivierten Innenohren ein zum *in vivo* Innenohr identisches Expressionsmuster auf. Hybridisierungssignale mit der *Trp-2* Probe zeigten außerdem, daß die Melanoblasten, die bei der Otocystenpräparation in das Mesenchym eingeschlossen sind, während der Kultivierung in das Innenohrepithel einwandern. Die Melanoblasten, im Mausembryo reichlich in der vestibulären Region und der Cochlea vorhanden (siehe Punkt 3.2.2.3), erreichen auch *in vitro* den cochleären Gang und das Epithel vom Utriculus, der Crus commune und den Ampullen.

In Abbildung 34 ist eine Auswahl an repräsentativen Hybridisierungsdaten zusammengestellt, die *Nkx5-1*, *Nkx5-2*, *sek* und *Trp-2* Expression in *in vitro* kultivierten Innenohren zeigen.

Die Fototafel zeigt insbesondere die komplementäre Expression der *Nkx5* Gene und *sek* in der Ampulle des anterioren Bogenganges und dem Utriculus (34A-H). Diese *in vitro* Daten sind direkt mit den Hybridisierungsdaten im *in vivo* Innenohr vergleichbar (siehe Abb. 12B,D). In 34I-L sind *Trp-2* hybridisierte Gewebeschnitte durch die Cochlea (34J) und die Ampulle des anterioren Bogenganges (34L) zu sehen. Hier wurden durch die *Trp-2* Hybridisierung Melanoblasten detektiert, die während der Kultivierung durch das ventrale Mesenchym in die *in vitro* differenzierte Stria vascularis und in das mesenchymale Gewebe um die Ampulle des anterioren Bogenganges herum eingewandert sind.



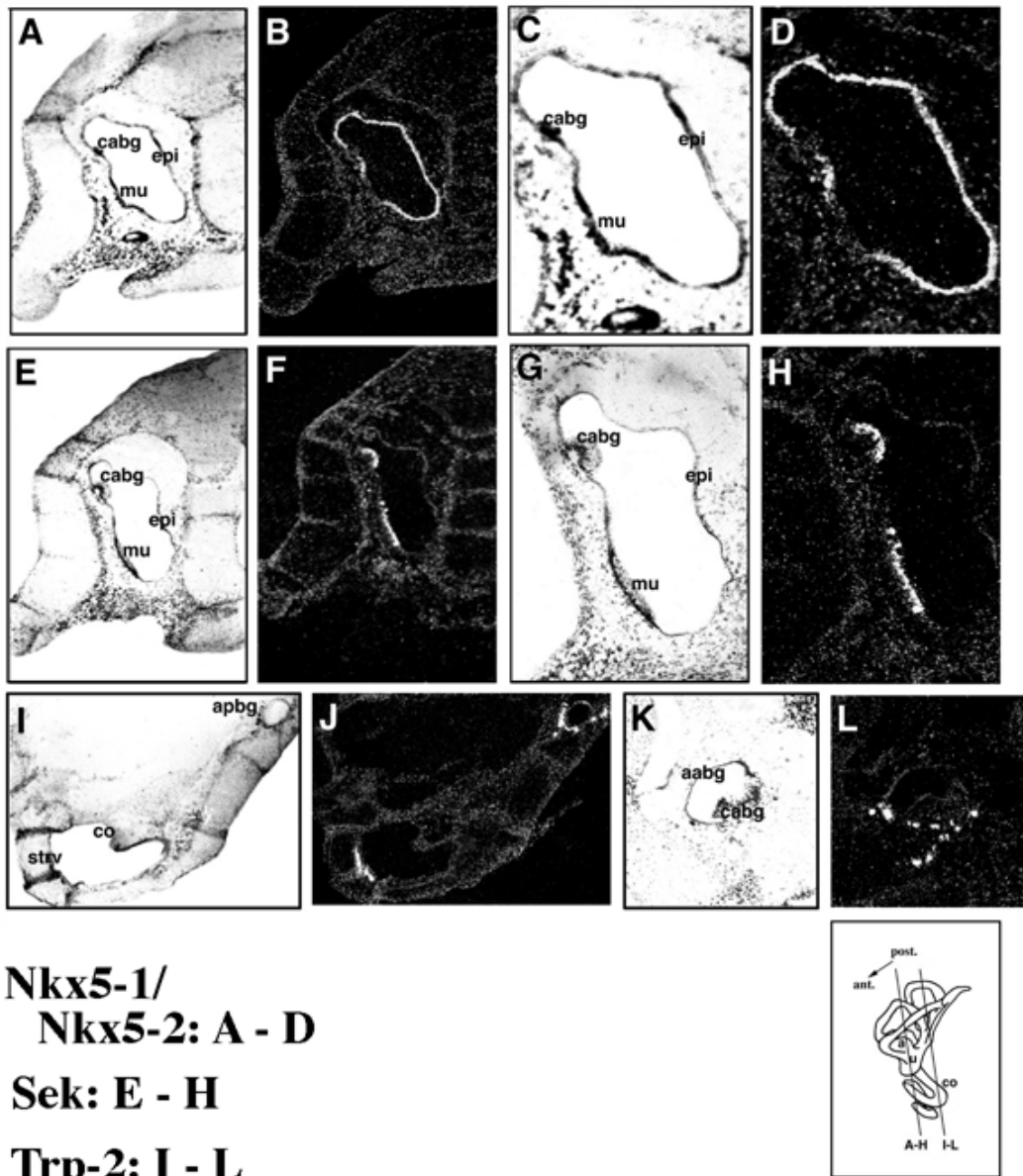


Abb. 34. *In situ* hybridisierte Gewebeschnitte durch *in vitro* kultivierte Innenohren, die *Nkx5-1* (A-D), *sek* (E-H) und *Trp-2* (I-L) Expression anzeigen. A,C,E,G,I,K sind die zu den Dunkelfeldaufnahmen B,D,F,H,J,L korrespondierenden Hellfeldbilder. B zeigt *Nkx5-1* Expression im Epithel der Ampulle des anterioren Bogengangs und des Utriculus an. In der Vergrößerung in D ist deutlich zu sehen, daß die sensorischen Regionen frei von Hybridisierungssignalen sind. F und H zeigen die zu *Nkx5-1* komplementäre *sek* Expression in der anterioren Crista ampullaris und der Macula utriculi. Die *Trp-2* Hybridisierungssignale in J und L detektieren in das kultivierte Ohrepithel eingewanderte Melanoblasten. (aabg, apbg) Ampulle des anterioren, posterioren Bogenganges, (cabg) Anteriore Crista ampullaris, (co) Cochlea, (epi) Nicht-sensorisches Epithel, (mu) Macula utriculi, (strv) Stria vascularis.

### 3.4.2 *In vitro* Kultivierung von isolierten Sinnesepithelien

Zur Untersuchung von Zelldifferenzierungsprozessen, die zur Ausbildung der Sinnesepithelien führen, wurde ein *in vitro* System optimiert, das speziell für die Kultivierung der sehr kleinen Gewebe geeignet ist. In diesem System werden die Sinnesepithelien im Kulturmedium exponiert, modifizierend wirkende Substanzen können so das zu untersuchende Epithel direkt erreichen (Warchol et al., 1993; Lefebvre et al., 1993). Hier wurden die Ampullen aus Innenohren am E14.5 isoliert und ihre Dächer für die Exposition der Cristae geöffnet (siehe Punkt 2.2.12). Die Epithelien wurden für vier Tage, dem E17.5 *in vivo* äquivalent, kultiviert. Es konnte gezeigt werden, daß eine histologische und molekulare Auswertung der winzigen Epithelien möglich ist.

#### 3.4.2.1 Optimierung der Kultivierungsbedingungen

Für die Kultivierung der Sinnesepithelien wurde das Innenohrorgankultursystem modifiziert, es wurden ein anderes Kulturmedium und eine höhere Inkubationstemperatur (Warchol et al., 1993) gewählt (siehe Punkt 2.2.13.2/3). Vorversuche zeigten, daß die sehr feinen Epithelien eine spezielle Anheftungsmatrix benötigen. Zu diesem Zweck wurden die Millipore-Filtermembranen, die auch für die Otocysten als Substrat dienten, mit Cell Tak, einem Proteingemisch beschichtet (siehe Punkt 2.2.13.3).

#### 3.4.2.2 Nachweis spezifischer Genexpression in den *in vitro* kultivierten Sinnesepithelien

Nach vier Tagen *in vitro* Kultivierung wurden die Epithelien histologisch und bezüglich der Aktivität des *Nkx5-1* Gens untersucht. Hierfür wurden die Polycarbonatfilter mit den angehefteten Bogengangsepithelien durch die Dehydratisierungsschritte geführt und anschließend in Paraffin eingebettet, wobei die Einwirkzeiten, der Größe der Epithelien angemessen, verkürzt wurden (siehe Punkt 2.2.9).

In Vorversuchen wurde die Resistenz der Filter gegenüber den Lösungen getestet. Es zeigte sich, daß sich in Paraffin eingebettete Filter mit dem Mikrotom gut schneiden ließen. In den Regionen, in denen die eingebetteten Sinnesepithelien lokalisiert waren, wurden die Blöcke in einer Schichtdicke von 5 µm geschnitten. Mikroskopisch ließ sich erkennen, daß die Sinnesepithelien in der *in vitro* Kultur differenzierten. Die Gewebeschnitte wurden mit radioaktiv markierter *Nkx5-1* Antisense-RNA *in situ* hybridisiert, um zu überprüfen, ob die Epithelien spezifische Genaktivität zeigen, beziehungsweise ob die Aktivität mit dieser Methode nachweisbar ist. *Nkx5-1* hybridisierte Gewebeschnitte von *in vitro* kultivierten,

isolierten Epithelien zeigen Genexpression in den die sensorischen Regionen umgebenden Epithelien, entsprechend der *in vivo* Situation, an (siehe Abb. 35).

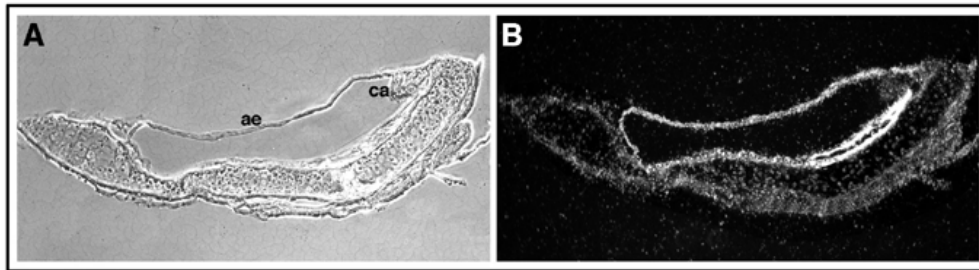


Abb. 35. *Nkx5-1 in situ* hybridisierter Gewebeschnitt durch ein kultiviertes ampulläres Epithel mit Crista. (A) Hellfeldaufnahme, die die Strukturen des kultivierten Epithels zeigt. (B) Die Dunkelfeldaufnahme zeigt eindeutige *Nkx5-1* Hybridisierungssignale im ampullären Epithel, die Crista weist entsprechend der *in vivo* Situation (vergl. Abb. 15) keine Genaktivität auf. (ca) Crista ampullaris, (ae) ampulläres Epithel.

### 3.5 Modifikationen im Innenohr-Organkultursystem. Zugabe von *Pax-2* Antisense-Oligonukleotiden zur Inhibierung der *Pax-2* Genfunktion *in vitro*.

Wie unter Punkt 3.4 bereits beschrieben, eignet sich das Organkultursystem dazu die Innenohrentwicklung *in vitro* zu modifizieren. Eine Möglichkeit der Modifikation ist die Blockierung der Translation selektiver Gentranskripte. Bezogen auf die Spezifität der Basenpaar-Hybridisierung, werden in diesen Versuchen einzelsträngige Antisense-Oligodesoxynukleotide deren Sequenz zu der spezifischen mRNA-Sequenz des Gens komplementär ist, eingesetzt (Augustine et al., 1995; Bavik et al., 1996). Die Theorie der komplementären Basenpaarung stellt sicher, daß die Oligonukleotide, durch Endocytose von der lebenden Zelle aufgenommen, selektiv an die zelluläre mRNA binden. Die für die Zielnachricht spezifische Hybridisierung resultiert im Abbau des Hybrids durch RNase H Spaltung an der Zielstelle (Agrawal et al., 1990) und damit in einer Blockierung der Synthese des Genprodukts.

Hier sollte, um die Modifizierbarkeit des Organkultursystems zu testen, die Funktion des *Pax-2* Gens im *in vitro* kultivierten Innenohr mittels Antisense-Oligonukleotiden inhibiert werden (Rothenpieler & Dressler, 1993).

Das *Pax-2* Gen erfüllt eine entscheidende Funktion bei der Ausbildung der Cochlea. Die gezielte Inaktivierung dieses Gens *in vivo* hatte zur Folge, daß sich in den Mutanten die Cochlea nicht entwickelte (Torres et al., 1996). Ungeklärt blieb weiterhin, welche Aufgabe dieses Gen in späteren Stadien der Innenohrentwicklung übernimmt, in denen es spezifisch im differenzierenden cochleären Gang exprimiert wird.

In der Versuchsreihe wurden gegenüber zellulären Exonukleasen resistente, Phosphorothioat-substituierte Oligodesoxynukleotide (Sharma & Narayanan, 1995), wie sie 1993 publiziert wurden (siehe oben) eingesetzt. Neben zwei verschiedenen Antisense-Oligonukleotiden

(AS14 und AS17) wurden drei Kontroll-Oligonukleotide, S14, S17 und SCR14, verwendet (siehe Punkt 2.1.7 und 2.2.13.4). S14 und S17 weisen die zum Sinnstrang der cDNA komplementäre Sequenz auf und können daher nicht an die mRNA binden, SCR14 besteht aus einer Zufallssequenz der im AS14-Oligonukleotid verwendeten Basen. Ein fünftes Oligonukleotid wurde mit Fluorescein markiert. Hierdurch sollte überprüft werden, in welchen Konzentrationen die Oligodesoxynukleotide erfolgreich in das Innenohrepithel eindringen.

Für die Innenohr *in vitro* Kulturen wurden Otocysten aus Embryonen am E13.5 präpariert.

### 3.5.1 Kultivierungsbedingungen

*In vitro* Kulturen von E13.5 Otocysten wurden für 5 Tage mit den ausgewählten Oligonukleotiden, die dem Kulturmedium in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt wurden, inkubiert (siehe Punkt 2.2.13.3). Um eine optimale Wirkung zu erzielen, wurde ein breiter Konzentrationsbereich der eingesetzten Oligonukleotide getestet (2.5 - 30  $\mu\text{M}$ ).

Ein Mediumwechsel unter Zugabe neuer Nukleotide fand täglich statt. *In vitro* kultivierte Innenohren des *in vivo* Äquivalentstadiums von E17.5 zeigen eine morphologische Weiterentwicklung der Cochlea sowie differenzierte Strukturen im cochleären Gang.

### 3.5.2 Die Verteilung der Oligonukleotide im kultivierten Innenohr

Fluorescein-markierte, unspezifische Oligonukleotide (siehe Punkt 2.2.13.4) wurden in verschiedenen Konzentrationen zum Kulturmedium gegeben und ihre Verteilung im Innenohrgewebe überprüft. Die unten stehende Tabelle faßt den intrazellulären Level der Fluorescein-markierten Kontroll-Oligonukleotide in Abhängigkeit von der Konzentration im Kulturmedium zusammen.

Konzentration der Fluorescein-markierten Oligos	5 $\mu\text{M}$	20 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$
Nachweis der Oligos im Innenohrgewebe durch Fluoreszenzmikroskopie (Blaufilter)	schwache Grünfärbung im Mesenchym um die Innenohrepithelien herum	starke Grünfärbung im Mesenchym und den Epithelien des Innenohres	"Überfärbung" des Innenohrgewebes

**Tab. 2. Konzentrationsabhängige Verteilung der Fluorescein-markierten Oligonukleotide im *in vitro* kultivierten Innenohr**

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß die Oligonukleotide, in einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  zum Kulturmedium gegeben, nicht in das Innenohrepithel eindringen. Bei einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  wurden die Oligonukleotide in großer Menge im kultivierten Gewebe detektiert. Das das Innenohrepithel umgebende Mesenchym zeigte dabei eine Hypertrophie. Die Innenohren, die bei einer Oligonukleotidkonzentration von 50  $\mu\text{M}$  kultiviert wurden, wiesen erhebliche Mißbildungen auf.

### 3.5.3 Der Effekt der Oligonukleotide auf die Innenohrentwicklung *in vitro*

Die zum Kulturmedium gegebenen Oligonukleotide bewirkten ab einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  eine Hypertrophie der kultivierten Innenohren, die bereits nach zwei Tagen Inkubation mikroskopisch sichtbar war. Dieser Effekt wurde unabhängig davon, ob die eingesetzten Oligonukleotide eine *Pax-2* Sense- oder Antisense-Sequenz aufwiesen, erzielt.

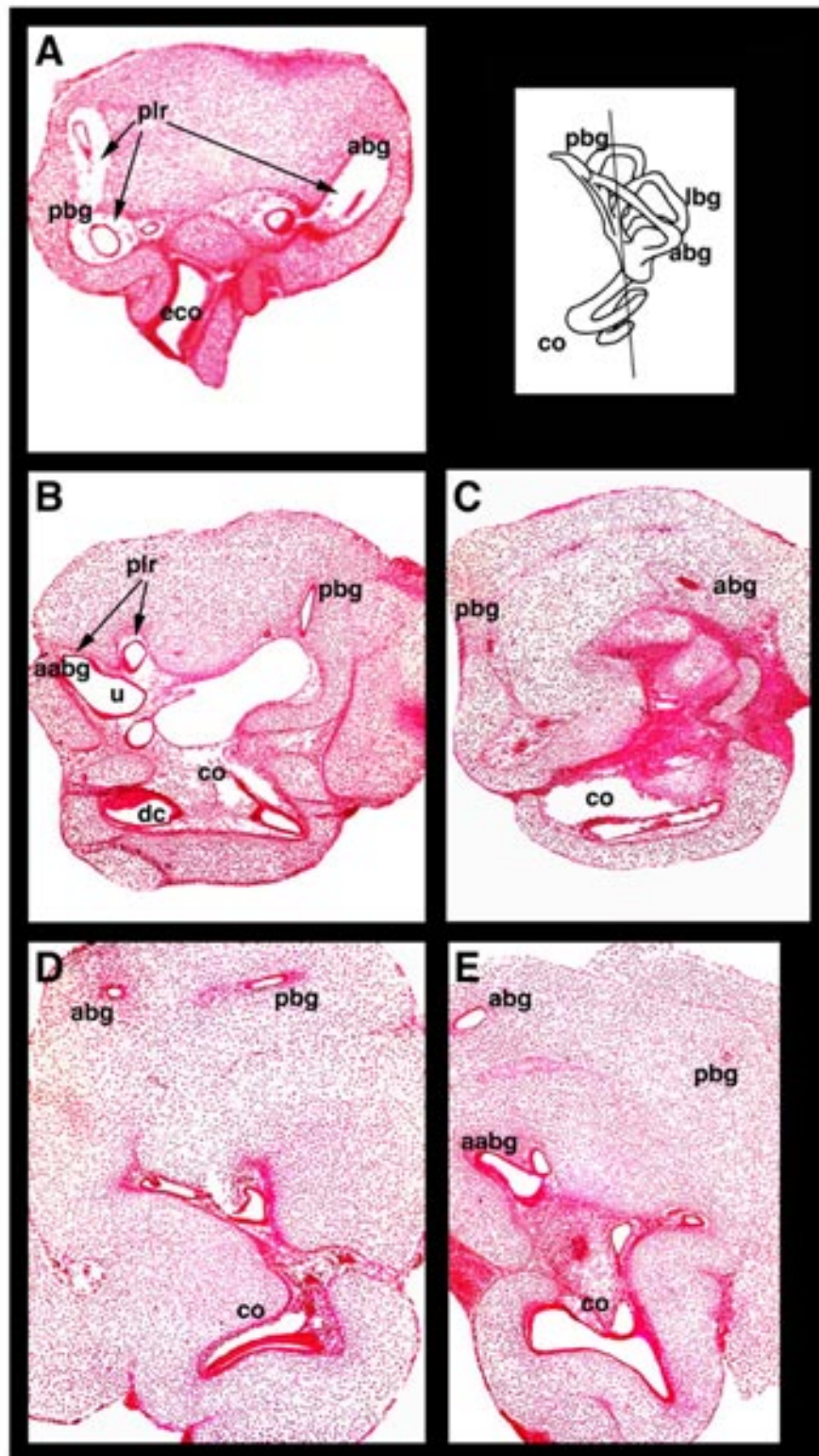
Die histologische Auswertung der kultivierten Epithelien zeigte, daß die Hypertrophie auf eine vermehrte Zellproliferation der das Innenohrepithel umgebenden, mesenchymalen Zellen zurückzuführen ist. Die kultivierten Innenohren wiesen zudem verengte Hohlräume im vestibulären Apparat und eine Reduktion des perilymphatischen Raumes auf. Bei hohen Oligonukleotidkonzentrationen fehlte der perilymphatische Raum ganz (siehe Abb. 36D/E). Mit der Verengung der Bogengänge und des utriculosacculären Raumes ging eine mangelhafte Ausbildung der Sinnesepithelien einher. Bei höheren Konzentrationen und einer starken Hypertrophie des Mesenchyms fand keine Differenzierung der Sinnesepithelien mehr statt (siehe Abb. 36D). Die Cochlea wies bei hypertrophiertem chondrogenen Mesenchym einen ähnlich verengten perilymphatischen Raum auf, was sich im Fehlen der Scala vestibuli und der Scala tympani (siehe Punkt 3.1.2) äußerte (vergleiche Abb. 36B/C mit 36D/E). Der cochleäre Gang zeigte nur bei sehr starker mesenchymaler Hypertrophie eine Verengung.

Die nachfolgende Tabelle faßt die konzentrationsabhängigen Versuchsreihen bezüglich des Phänotyps der *in vitro* Innenohren und der Anzahl der durchgeführten Kultivierungen zusammen. Es ist deutlich zu erkennen, daß der zellproliferative Effekt auf das chondrogene Mesenchym und die Mißbildungen des Innenohrepithels konzentrationsabhängig sind. Die histologische Auswertung der *in vitro* kultivierten Innenohren aus einer konzentrationsabhängigen Versuchsreihe zeigt immer auch eine gewisse Variabilität des Phänotyps, wie sie bei den *in vitro* kultivierten Innenohren generell sichtbar war (siehe Punkt 3.4.1.2).

	2.5 $\mu$ M	5 $\mu$ M	10 $\mu$ M	20 $\mu$ M	30 $\mu$ M
<b>S14</b>	<b>6 Exemplare</b> Keine Veränderung im Vergleich zu <i>in vitro</i> Innenohren, die ohne Oligonukleo- tide kultiviert wurden	<b>7 Exemplare</b> Hypertrophie des Mesenchyms, verengter peri- lymphatischer Raum, Verengung der Lumina des vestibulären Apparates	<b>7 Exemplare</b> Unkontrolliert e Hypertrophie des Mesenchyms, kein perilymphatischer Raum, größtenteils keine oder nur gering differenzierte Sinnesepithe- lien im vestibulären Apparat, teilweise verengter cochleärer Gang, keine Scala vestibuli und tympani	<b>7 Exemplare</b> Derselbe Phänotyp wie in den Versuchsreih- en, die mit 10 $\mu$ M durch- geführt wurden - noch verstärkt -	<b>5 Exemplare</b> Hypertrophie des Mesenchyms, die mit erheblichen Mißbildungen des Innenohres einhergeht
<b>SCR14</b>	<b>6 Exemplare</b> Morphologie siehe S14	<b>7 Exemplare</b> Morphologie siehe S14	<b>7 Exemplare</b> Morphologie siehe S14	<b>7 Exemplare</b> Morphologie siehe S14	
<b>S17</b>		<b>5 Exemplare</b> Morphologie siehe S14	<b>4 Exemplare</b> Morphologie siehe S14	<b>4 Exemplare</b> Morphologie siehe S14	<b>4 Exemplare</b> Morphologie siehe S14
<b>AS14</b>	<b>6 Exemplare</b> Morphologie siehe S14	<b>9 Exemplare</b> Morphologie siehe S14	<b>11 Exemplare</b> Morphologie siehe S14	<b>11 Exemplare</b> Morphologie siehe S14	<b>7 Exemplare</b> Morphologie siehe S14
<b>AS17</b>	<b>7 Exemplare</b> Morphologie siehe S14	<b>7 Exemplare</b> Morphologie siehe S14	<b>4 Exemplare</b> Morphologie siehe S14	<b>4 Exemplare</b> Morphologie siehe S14	<b>4 Exemplare</b> Morphologie siehe S14

**Tab. 3.** Überblick über die Anzahl der Otocysten, die bei den verschiedenen Oligonukleotidkonzentrationen kultiviert wurden.

Die Abbildung 36 zeigt H/E gefärbte Gewebeschnitte durch *in vitro* Innenohren, die mit Sense- und Antisense-Oligonukleotiden kultiviert wurden und den Phänotyp der modifizierten Innenohren repräsentieren (vergleiche auch mit Abb. 33).



**Abb. 36.** Gezeigt sind H-E gefärbte Gewebeschnitte durch *in vitro* kultivierte Innenohren, die sich aus in E13.5 präparierten Otocysten unter Zusatz von *Pax-2* Sense- (B und D) und Antisense- (C und E) Oligonukleotiden entwickelten. A zeigt ein *in vitro* Innenohr mit gut entwickelten Bogengängen und weitem perilymphatischen Raum, das ohne Zugabe von Oligonukleotiden kultiviert wurde. Die Cochlea ist in ihrer basalen Windung angeschnitten. (B und C) Innenohren, die mit Sense- und Antisense-ODNs in einer Konzentration von 5  $\mu$ M *in vitro* kultiviert wurden. Der perilymphatische Raum ist in beiden Innenohren sichtbar verengt. In C ist auch eine Verengung der Bogengänge sichtbar. Die Cochlea ist normal entwickelt. (D und E) Innenohren, die mit Sense- und Antisense-ODNs in einer Konzentration von 10  $\mu$ M kultiviert wurden. In beiden Innenohren hypertrophiert das Mesenchym stark. Es ist kein perilymphatischer Raum sichtbar, die Hohlräume des vestibulären Apparates sind vorhanden, aber stark verengt. E zeigt in der Ampulle des anterioren Bogenganges und im angegliederten Utriculus undifferenzierte Anlagen der Sinnesepithelien. (abg) Anteriorer Bogengang, (aabg) Ampulle des anterioren Bogenganges, (co) Cochlea, (dc) Ductus cochlearis, (eco) Epithel des cochleären Ganges, (lbg) Lateraler Bogengang, (pbg) Posteriorer Bogengang, (plr) Perilymphatischer Raum, (u) Utriculus.



## 4. Diskussion

### 4.1 Überblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Expressionsdomänen von Genen, welche spezifisch im Innenohr exprimiert werden, definierten Zelltypen im sich entwickelnden Innenohr zugeordnet. Insbesondere wurden die in unserer Arbeitsgruppe isolierten Homeoboxgene *Nkx5-1* und *Nkx5-2* untersucht, desweiteren die Gene *Pax2* und *sek*. Im folgenden werden die Expressionsdaten unter dem Gesichtspunkt der Bestimmung von Zellschicksalen diskutiert. Weiterhin wird diskutiert, in welche Prozesse der Innenohrentwicklung die untersuchten Gene involviert sein könnten.

Die Bildung des Innenohrs resultiert aus dem Zusammenspiel mehrerer Faktoren. Mesodermale und neuronale Signale initiieren die Innenohrentwicklung über die Anschaltung innenohrspezifischer Gene, deren Aktivität zur Ausbildung definierter Strukturen des sich entwickelnden Innenohrs führt. Die Analyse von Innenohrmutanten sollte Aufschluß darüber geben, ob die Aktivität der untersuchten Gene, als Folge des Verlusts eines funktionsfähigen Proteins und der daraus resultierenden morphologischen und möglicherweise genetischen Veränderungen, gestört ist. In diesem Zusammenhang wird unter anderem diskutiert, ob zur Aufrechterhaltung der *Nkx5-1* Expression Signale aus dem Hinterhirn notwendig sind (siehe Einleitung). Die *splotch* Mausmutanten, welche im Hinterhirn einen inkompletten Neuralrohrschluß aufweisen, ließen bisher die Frage offen, ob aus der Neuralleistenregion Melanoblasten in das sich entwickelnde Innenohr einwandern. Anhand der erzielten Hybridisierungsdaten mit dem Melanoblasten-spezifischen Markergen *Trp2* wird hier gezeigt, daß in *splotch* Embryonen keine Wanderung von Melanoblasten stattfindet.

In der Mausmutante *fidget*, in der die vestibuläre Morphogenese des Innenohrs gestört ist, wurde untersucht, ob die Expression bekannter Gene, die im vestibulären Apparat aktiv sind, verändert ist. Die erstellten Expressionsdaten werden im folgenden mit publizierten Daten in Zusammenhang gestellt und verschiedene mögliche molekulare Prozesse der Innenohrentwicklung diskutiert.

Ein geeignetes System, um die Funktion und auch die Regulation von Genen zu untersuchen, stellen modifizierbare *in vitro* Kulturen dar. Zur Durchführung solcher funktionellen Untersuchungen wurde im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit ein Mausinnenohr *in vitro* Kultursystem etabliert. In diesem Kapitel wird unter anderem die Nützlichkeit dieses Modellsystems diskutiert und ein Ausblick für die Anwendungsmöglichkeiten gegeben.

## 4.2 Die spezifische Expression von Genen im sich entwickelnden Innenohr der Maus

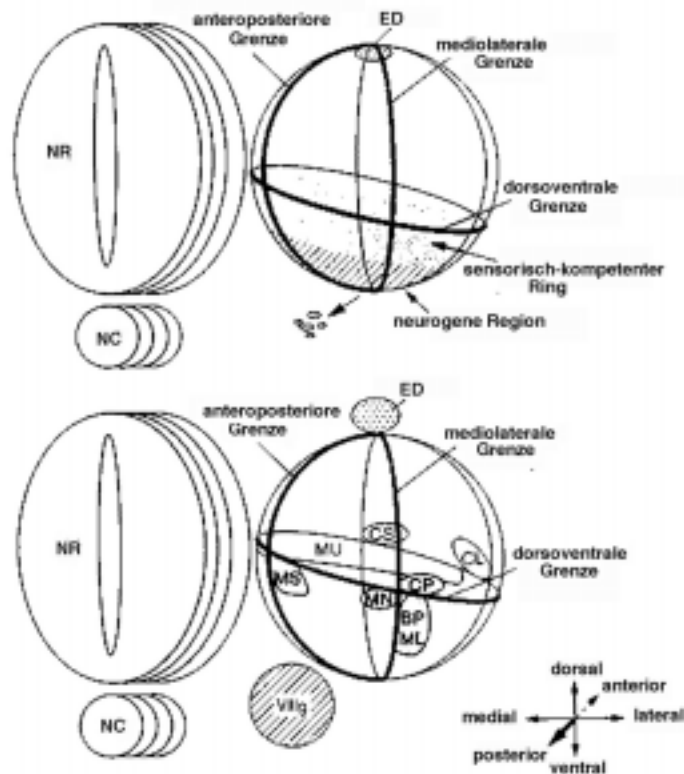
### 4.2.1 Innenohrspezifische Genexpression in Kompartimenten der Ohranlage

Im Rahmen der hier durchgeführten Analyse wurden die Expressionsdomänen für die Gene *Nkx5-1*, *Nkx5-2*, *Pax2* und *sek* in der Ohranlage und im differenzierenden Innenohr bestimmt. Alle vier hier analysierten Gene sind Mitglieder von Genfamilien, die entscheidende Rollen in morphogenetischen Prozessen der Embryonalentwicklung spielen (siehe Einleitung). Die *Pax* Gene beispielsweise, eine besonders gut untersuchte Genfamilie, üben alle eine entscheidende Funktion im sich entwickelnden Embryo aus. Zum Beispiel *Pax-1* in der Entwicklung paraxialer Mesodermderivate (Balling et al., 1988), *Pax-3* bei der Wanderung von Neuralleisten- und Muskelvorläuferzellen (Bober et al., 1994; Epstein et al., 1991) und *Pax-6* in der Augen und Nasenentwicklung (Hadler et al., 1995; Hill et al., 1991). Die *Nkx*-Genfamilie ist funktionell bisher weniger gut untersucht. Für *Nkx2.5* konnte, durch die gezielte Inaktivierung dieses Gens, dessen essentielle Rolle bei der Ausbildung des Herzens aufgezeigt werden (Lyons et al., 1995). Für das Gen *sek*, das für eine Rezeptorprotein Tyrosinkinase codiert, wurde eine Rolle bei der Entwicklung des Hinterhirns beschrieben (Xu et al., 1995).

Basierend auf der funktionellen Relevanz der verwandten, regulatorischen Gene, war es anzunehmen, daß die hier zu untersuchenden Gene entscheidende Rollen bei der Entwicklung des Innenohres spielen. Die hier präsentierte Analyse sollte für weitere Studien an morphogenetischen Ereignissen und der Zelltypspezifizierung bei der Entwicklung des Mausinnenohres nützlich sein. Die Beschreibung der Expressionsmuster stellt insbesondere die Basis für funktionelle *in vitro* Studien, die notwendig sind, um Genfunktionen zu untersuchen, welche mit gezielter Geninaktivierung *in vivo* („Knock-out“) nicht erfaßt werden können (Copp, 1995). Die Wildtyp Expressionsmuster können außerdem in Mäusen mit Innenohrdefekten überprüft werden und Hinweise über die durch die Mutation betroffenen Gene geben.

Die spezifische Expression von Genen in der Ohranlage gibt zudem, verglichen mit der späteren Expression dieser Gene in definierten Strukturen des Innenohrs, Informationen über die Spezifizierung und das Schicksal von Zellen im Ohrvesikel. Es ist zu erwarten, daß die regionalen Identitäten (siehe Einleitung) durch die Expression einer unterschiedlichen Kombination ausgewählter Gene geprägt wird. Fekete postuliert acht Kompartimente, die durch drei radiärsymmetrische Grenzen (siehe hypothetisches Grenzenmodell in Abbildung 37) festgelegt werden. Es werden verschiedene, spezifisch in der Ohranlage exprimierte Gene, wie Mitglieder der Homeoboxgenfamilien *Pax* (Gruss & Walther, 1992), *Otx* (Simeone et al., 1993), *Msx* (Davidson, 1995) und *Dlx* (Akimenko et al., 1994; Stein et al., 1996) als Kandidaten angesehen, Grenzen im frühen Otocysten zu definieren (Kiernan & Fekete, 1997). Weitere Musterbildung an den Kompartimentsgrenzen findet möglicherweise durch

die Expression eines "short range" Induktors oder eines "long range" Morphogens (Lawrence & Struhl, 1996) statt.



**Abb. 37. Hypothetisches Modell der Zellschicksalspezifizierung im Otocysten von Hühnchen (Fekete, 1996).** (BP) Basillarpapille, (CL) laterale Crista, (CP) posteriore C., (CS) anteriore C., (ED) endolymphat. Gang, (MU) Macula utriculi, (MS) Macula sacculi, (NC) Notochord, (NR) Neuralrohr.

Das *Nkx5-1* Gen wird am E8.5 in der anterioren Hälfte der Ohrplakode, die in Form von Gewebeverdickungen zu beiden Seiten des zukünftigen Hinterhirns sichtbar wird, angeschaltet. Mit der Invagination des Ohrephithels zum Otocysten, verlagert sich die Expressionsdomäne von Hinterhirn fort nach dorsolateral und markiert hier eine Region, die den Ursprung für den vestibulären Apparat des Innenohres, einschließlich der sensorischen Epithelien der Bogengänge, gibt (siehe Abb. 37). Nach dem hypothetischen Grenzenmodell markiert die Expressionsdomäne das dorsolaterale Kompartiment. Gewebeschnitte durch die hybridisierten E10.5 Embryonen zeigen *Nkx5-1* Signale, die die postulierte, mediolaterale Grenze überschreiten. Eine identische Expression im Ohrvesikel zeigen zwei nahe verwandte Gene im Hühnerembryo, das *SOHo-1* und *GH6* (Kiernan & Fekete, 1997), die ebenfalls für den sich entwickelnden vestibulären Apparat spezifisch sind. Wenn die mediolaterale Kompartimentsgrenze, wie in Abbildung 37 eingezeichnet, radiärsymmetrisch durch den Otocysten verläuft, dann werden diese Gene über die postulierten Grenzen hinaus exprimiert. Komplementär exprimierte Gene, welche in der dorsomedialen Hälfte des Ohrvesikels aktiv sind, wurden bisher nicht beschrieben. Allerdings weist das *Pax-2* Gen, welches am E9.0 in

der invaginierenden Plakode angeschaltet wird, eine zu *Nkx5-1* und verwandten Genen komplementäre Expressionsdomäne im ventromedialen Kompartiment des Otocysten auf. Interessanterweise wird die Aktivität dieses Gens ebenfalls über die postulierte mediolaterale Grenze hinaus, am anterioren und posterioren Pol des Vesikels detektiert. Es wäre möglich, daß Kompartimentsgrenzen im Otocysten durch die überlappende Expression komplementärer Gene entstehen, wie es beispielsweise für die Segmentierung im *Drosophila* Embryo gezeigt worden ist (Lawrence & Morate, 1994). Andererseits kann in Erwägung gezogen werden, daß radiärsymmetrische Grenzen nicht existieren. Zu beiden Seiten der postulierten, mediolateralen Grenze könnten zwei Kompartimentsgrenzen existieren. Diese beiden, ein dem Hinterhirn angrenzendes und ein laterales Kompartiment bestimmenden Grenzen würden gleichsam ein mediales Kompartiment festlegen, in der Gene überlappend aktiv sind. Die Aktivität des *Nkx5-1* Gens im E10.5 Embryo markiert das gesamte laterale Ohrvesikelepithel, auch die Regionen, die sensorische Felder spezifizieren (siehe Abb. 37). Die sensorischen Regionen werden einen halben Entwicklungstag später durch die Expression des *Msx-1* Gens charakterisiert und geben den Ursprung für die Cristae ampullaris. Am E11.5 geht mit der Invagination und Ausstülpung des Ohrepithels zur Formierung der Bogengänge eine Verdickung des Epithels in den Regionen, die den Ursprung für die Sinnesepithelien geben, einher. In diesem Stadium ist in den Anlagen der Sinnesepithelien keine *Nkx5-1* Genaktivität mehr nachweisbar. Möglicherweise inhibiert das *Nkx5-1* Gen sensorische Differenzierung und wird durch ein Gen in den Regionen, die die Sinnesepithelien ausbilden, herunterreguliert. Solch ein Prozeß wird möglicherweise durch die Expression diffundierbarer Morphogene in den die sensorischen Regionen flankierenden Zellen ausgelöst (Kimura et al., 1963; Dohlman, 1964). Für verschiedene Gene, wie *BMP4*, *BMP7* und *p75 NGFR*, die für sezernierte Faktoren codieren (siehe Einleitung), ist eine Aktivität in den sensorischen Regionen der Bogengänge beschrieben worden (Bartheld et al., 1991; Wu & Oh, 1996; Oh et al., 1996). Wie das *Nkx5-1* Gen sensorische Differenzierung hemmen könnte, ob es durch ein „sensorisches“ Gen herunterreguliert wird oder ob es eine andere Rolle spielt, ist unklar. Eine Überexpression unter dem Promotor eines Gens, das spezifisch in den sensorischen Regionen exprimiert wird, könnte hier Aufschluß geben.

Die ventrale Hälfte des Ohrvesikels stellt die Anlage für die Cochlea, den Sacculus und die Maculae (Li et al., 1978; siehe Abbildung 37). Durch ein „Knock-out“ Experiment konnte nachgewiesen werden, daß *Pax-2* schon sehr früh in der Entwicklung dieser Strukturen eine wichtige Funktion ausübt. *Pax-2* <sup>-/-</sup> Mäuse weisen eine vollständige Agenesie der Cochlea auf, lediglich ein ballförmiges, rudimentäres Epithel ist vorhanden, jegliche Anlage des Hörsinnesepithels fehlt. Möglicherweise spezifiziert das *Pax-2* Gen ein von Kiernan et al. (1997) postuliertes, ventrales Kompartiment und ist damit für die Ausbildung ventraler Innenohrstrukturen essentiell.

Es ist anzunehmen, daß *Pax-2* und *Nkx5-1* komplementäre Rollen bei der Spezifizierung des Ohrvesikels und dabei bei der Ausbildung des Innenohres spielen. Nahezu ausgeschlossen ist

dabei eine direkte, gegenseitig negative Regulation. Das *Nkx5-1* Gen wird in *Pax-2*  $-/-$  Mäusen und das *Pax-2* Gen in *Nkx5-1* Mutanten normal exprimiert (Torres, mündl. Mitteilung; Hadrys et al., 1998).

Das Gen *Sek*, welches für ein Rezeptorprotein Tyrosinkinase codiert, ist im E9.5 Embryo, mit dem *Nkx5-1* Gen überlappend, sehr stark im anterioren, dorsolateralen Kompartiment aktiv, das für die Bildung der Bogengänge spezifiziert ist. Schwache Hybridisierungssignale wurden bei längerer Färbedauer der Embryonen fast ubiquitär im gesamten Vesikelepithel detektiert, wodurch eine weitreichende Funktion des *sek* Gens bei der Innenohrentwicklung indiziert wird. Überraschenderweise zeigt dieses Gen im differenzierenden Innenohr, untersucht am E14.5 und E17.5, ein zum *Nkx5-1* Gen komplementäres Expressionsmuster. Im vestibulären Apparat ist *sek* in allen sensorischen Strukturen, nicht aber in den *Nkx5-1* exprimierenden, nicht-sensorischen Epithelien, aktiv. In der Cochlea wurde ein sehr breites Expressionsmuster detektiert, welches vor allem eine Beteiligung dieses Gens an der Ausbildung der perilymphatischen Räume der Cochlea, die mesenchymalen Ursprungs sind, vermuten läßt (siehe unten). Während der Entwicklungsstadien 11.5 und 13.0, einer Periode, in der extensive morphogenetische Bewegungen stattfinden und die meisten morphologischen Teile des Innenohres angelegt werden, unterliegt die *sek* Expressionsdomäne einer dynamischen Veränderung (siehe Abbildung 38). Am E13.0 wird *sek* erstmals in mesenchymalen Zellen um den cochleären Gang herum angeschaltet. Eine Aktivität dieses Gens in vestibulären Strukturen, wie sie am E9.5 durch die Expressionsdomänen im anterodorsolateralen Vesikelepithel indiziert wurde, fehlt. Im Gegensatz zur dynamischen Veränderung des *sek* Expressionsmusters, wird das *Nkx5-1* Gen auch in späteren Stadien der Innenohrentwicklung in den nicht-sensorischen Epithelien des vestibulären Apparates exprimiert (siehe Abb. 38). Hiervon ausgenommen ist der Sacculus, dessen Ursprung der ventralen Hälfte des Otocysten zugeordnet wird und dessen Bildung mit der Entwicklung der Cochlea gekoppelt ist (Steel, 1995). Am E15.5 wird das *Nkx5-1* Gen zusätzlich in der Stria vascularis in der Cochlea angeschaltet (siehe unten). Diese Expression läßt sich nicht aus der Expressionsdomäne im dorsalen Ohrvesikelepithel ableiten. Es ist anzunehmen, daß im differenzierenden Innenohr die Aktivität der untersuchten Gene durch andere Mechanismen reguliert wird, als in der frühen Phase der Ohrentwicklung. Die weitreichende Expression des *Nkx5-1* Gens in den nicht-sensorischen Epithelien des vestibulären Apparates deutet auf eine Funktion des Gens bei der Bogengangsformation hin. Dies konnte mittels der in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten gezielten Inaktivierung von *Nkx5-1* in Mäusen eindeutig gezeigt werden (Hadrys et al., 1998). In den Mausmutanten ist der vestibuläre Teil des knöchernen Labyrinthes deformiert. Möglicherweise ist *Nkx5-1* in epithelial-mesenchymale Interaktionen, die die Innenohrmorphogenese steuern, involviert.

*Nkx5-2* Genaktivität in spezifischen Strukturen des sich entwickelnden Innenohres wird erstmals am E14.5 mittels *in situ* Hybridisierung auf Gewebeschnitten detektiert. Wie bereits für die Gehirnexpression beschrieben (Rinkwitz-Brandt et al., 1995), wird das *Nkx5-2* Gen

auch im Innenohr mit *Nkx5-1* räumlich identisch exprimiert. Möglicherweise kann *Nkx5-2* Funktionen von *Nkx5-1* ersetzen.

Die ursprüngliche Komplementarität der Gene *Nkx5-1* und *Pax-2* hebt sich im differenzierenden Innenohr teilweise auf. *Pax-2* wird entsprechend der Transkriptverteilung im ventralen Ohrvesikel in der Cochlea, im Sacculus und auch im ventralen Teil des Utriculus, einschließlich der Maculae, exprimiert. Die im Epithel des Utriculus und in der Stria vascularis der Cochlea mit *Nkx5-1* überlappende Expression zeigt, daß sich die Aktivitäten der beiden Gene im differenzierenden Innenohr nicht gegenseitig inhibieren. Die gemeinsame Expression im Epithel des Utriculus könnte auch auf eine gemeinsame Expression beider Gene in Zellen an der dorsoventralen Grenze im Ohrvesikel hinweisen und ein weiteres Indiz dafür sein, daß diese Gene durch unterschiedliche Faktoren reguliert werden und sich nicht gegenseitig beeinflussen.

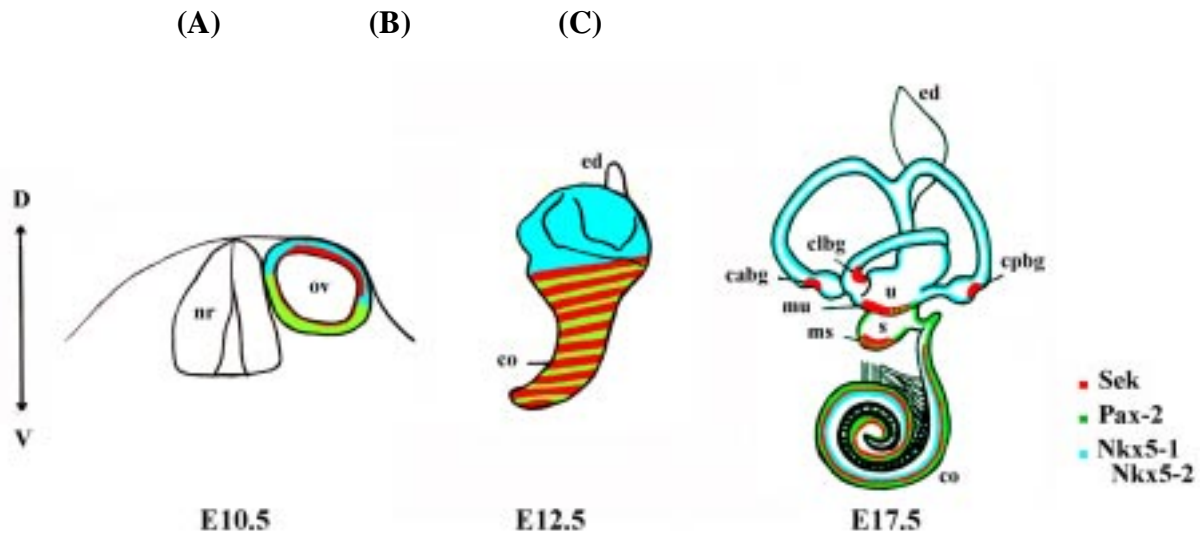


Abb. 38. Zusammenfassende, schematische Darstellung der Expressionsdomänen von *Nkx5-1/Nkx5-2*, *Pax-2* und *sek* im sich entwickelnden Innenohr von Mausembryonen des Entwicklungsstadiums E17.5 (C), im Vergleich zur frühen Expression dieser Gene im Otocysten (A,B). (A,B) Schematische dorsoventral (d - v) Verteilung der *Nkx5-1*, *Pax-2* und *sek* Gentranskripte im Epithelium des E10.5 und E12.5 Otocysten. (cabg, clbg, cpbg) Crista des anterioren, lateralen, posterioren Bogenganges, (co) cochleärer Gang, (ed) endolymphatischer Gang, (mu, ms) Macula utriculi, sacculi, (nr) Neuralrohr, (ov) Ohrvesikel, (u) Utriculus, (s) Sacculus.

#### 4.2.2 Expression im cochleären Gang

Die vier analysierten Gene zeigen in späteren Stadien der Innenohrentwicklung eine spezifische Expression in der sehr komplex gebauten Cochlea. Eingebettet in die Knochenkapsel winden sich der mit Endolymph gefüllte cochleäre Gang, der das Cortische Organ, ein hochspezialisiertes Sinnesepithel, beherbergt und zwei umgebende perilymphatische Räume. Die Differenzierung dieser Strukturen beginnt am E13.5.

Im ovalär erscheinenden Querschnitt eines cochleären Ganges im E13.5 Innenohr werden ein mehrreihiges basales Epithel aus dem das Cortische Organ entsteht und ein einschichtiges, kubisches Epithel, das das Dach des cochleären Ganges bildet, sichtbar. Das Dach liefert die mediale und die laterale Wand des Ductus.

Die Zellen der medialen Wand sind flach und stellen die Anlage der Reissnerschen Membran dar, welche das lockere, angrenzende Mesenchym, aus dem die Scala vestibuli, ein großer, mit Endothel ausgekleideter perilymphatischer Hohlraum, entsteht, vom cochleären Gang trennt. Der zweite perilymphatische Hohlraum wird unterhalb der basalen Wand des dreieckförmigen Ganges angelegt. Das *sek* Gen, welches während der gesamten Differenzierung des Innenohres im cochleären Mesenchym und der Reissnerschen Membran exprimiert wird, ist möglicherweise in die Ausbildung der perilymphatischen Räume der Cochlea involviert.

Am oberen Teil der lateralen Wand des cochleären Ganges verdichtet sich das Mesenchym und nimmt an der Bildung der Stria vascularis, einer Struktur, in der Epithel, Gefäße und Bindegewebe in enger Beziehung zueinander stehen, teil. Durch die Stria vascularis wird das Ionengleichgewicht in der Endolymphe reguliert. Der Prominentia spiralis, die den unteren Teil der lateralen Wand des Ductus stellt, wird eine ähnliche Funktion zugeschrieben, allerdings bleibt ihr flaches Epithel scharf vom darunterliegenden Bindegewebe getrennt. Das *Pax-2* Gen wird in diesen beiden Strukturen bis nach der Geburt exprimiert. Es ist anzunehmen, daß *Pax-2* neben einer frühen Funktion, ohne die sich die Cochlea nicht ausbilden kann (Torres et al., 1996), auch eine spätere Funktion, bei der Ausdifferenzierung spezialisierter Strukturen in der lateralen Wand des cochleären Ganges, erfüllt. Hier überlappt die Expressionsdomäne mit der der *Nkx5* Gene, die im differenzierenden Innenohr in den epithelialen Zellen der Stria vascularis aktiv sind. Möglicherweise sind *Nkx5-1* und *Nkx5-2* in epithelial-mesenchymale Interaktionen, die zur Bildung der Stria vascularis führen, involviert. Eine mögliche Rolle der beiden Gene bei epithelial-mesenchymalen Interaktionen wurde bereits für die Ausbildung des vestibulären Apparats beschrieben (siehe oben). In der Stria vascularis ist das *sek* Gen nicht aktiv, womit *sek* auch in der Cochlea (vergl. Punkt 3.1.1.2, Abb. 15) ein zu den *Nkx5* Genen komplementäres Expressionsmuster aufweist.

Die basale Wand des dreieckförmigen Ganges birgt das hochspezialisierte Hörsinnesepithel, das Cortische Organ, das über die gesamte Länge der Cochlea eine Reihe innerer und drei Reihen äußerer Haarzellen enthält. Die Haarzellen sind in ein kompliziertes Stützsystem eingefaßt und werden von einer gallertartigen Schicht, der Membrana tectoria überdacht. Die Membrana tectoria wird vom Limbus spiralis, einer bindegewebigen Leiste getragen und von seinen Epithelzellen sowie von dem angrenzenden Sulcusepithel, das sich nachfolgend zum Sulcus spiralis internus einsenkt, gebildet. (Weibel, 1957; Thews et al., 1989). Das *sek* Gen wird in Strukturen, die sich aus der basalen Wand des cochleären Ganges entwickeln, relativ breit exprimiert. Es ist im Epithel des Limbus spiralis und des Sulcus internus aktiv und

könnte somit in die Bildung der Membrana tectoria involviert sein. Möglicherweise spielt das Gen, ebenso wie *Pax-2*, bei der Differenzierung der Haarzellen eine Rolle.

### 4.3 Analyse der Genexpression in Mausmutanten

In Mausstämmen, die Mißbildungen im Innenohr aufweisen, sind Gene, die in die Entwicklung des Innenohres involviert sind, in ihrer Funktion gestört. Viele Innenohrmutanten sind lange bekannt (Deol, 1983) und wurden, ohne das mutierte Gen identifiziert zu haben, morphologisch untersucht oder als ein Modellsystem verwendet, um die Mechanismen aufzuklären, die der Innenohrentwicklung zugrunde liegen (siehe Einleitung).

In einigen Mausmutanten sind die Innenohrmißbildungen auf fehlende ohrinduzierende und/oder ohrerhaltende Signale aus dem Hinterhirn zurückzuführen (siehe Einleitung). Diese Mäuse weisen in sehr frühen Embryonalstadien Störungen in der Entwicklung des Hinterhirns auf - häufig ist die Rhombomerenformation gestört, die sich im Fehlen von Rhombomer 5, das als Quelle der ohrinduzierenden Signale ausgemacht wurde, äußert. Durch fehlende neurale Steuerungssignale werden bestimmte Zielgene im sich entwickelnden Innenohr nicht angeschaltet und die Determinierung und Differenzierung bestimmter Zelltypen findet nicht statt.

In Mausmutanten, die unabhängig von einer Mißbildung des Hinterhirns Defekte im Innenohr aufweisen (z. B. *fidget*, *shaker 1*) ist höchstwahrscheinlich die Funktion von spezifisch im Innenohr exprimierenden Genen gestört (Steel, 1995). Diese Mutanten zeigen Defekte in distinkten Regionen des Innenohres. Es werden neuroepitheliale, vestibuläre und cochleosacculäre Defekte unterschieden (Steel & Brown, 1994). Teilweise sind die mutierten Gene identifiziert worden (Gibson et al., 1995). Die gezielte Inaktivierung der Gene *Pax-2*, *Otx-1*, *isk*, *TGF $\beta$ -2*, *Brn-3.1* und *FGFR3* (Torres et al., 1996; Acampora et al., 1996; Vetter et al., 1996; Sanford et al., 1997; Erkman et al., 1996; Colvin et al., 1996) hat die essentielle Funktion einzelner, spezifisch im Innenohr exprimierter Gene gezeigt. Bei keiner dieser Mutanten wurden bislang weitere Moleküle identifiziert, die durch die Inaktivierung dieser Gene betroffen sind.

#### 4.3.1 Die Aktivität des *Nkx5-1* Gens ist unabhängig von induktiven Signalen aus dem sich entwickelnden Hinterhirn

In der hier vorliegenden Analyse wurde der Frage nachgegangen, ob das *Nkx5-1* Gen durch Faktoren aus dem sich entwickelnden Hinterhirn reguliert wird.



Der Anschaltzeitpunkt des *Nkx5-1* Gens in der Ohrplakode erfolgt zeitgleich mit der Bildung der Rhombomere im sich angrenzenden, entwickelnden Hinterhirn. Zu diesem Zeitpunkt sind Gene aktiv, die bei der Rhombomerenformation eine Rolle spielen. Das *Hoxa-1* Gen wird spezifisch im sich entwickelnden Hinterhirn, posterior von Rhombomer 3 exprimiert (Murphy et al., 1989). Die gezielte Inaktivierung dieses Gens (Chisaka et al., 1992; Lufkin et al., 1991) erzeugte eine Mutante, in der das Rhombomer 5, das als Quelle der ohrbildenden Signale ausgemacht wurde (siehe oben), vollständig fehlt und in der das Innenohr der *kreisler* Maus ähnlich mißgebildet ist (Mark et al., 1993). Es ist anzunehmen, daß in dieser Mutante, bedingt durch die gestörte Rhombomerenformation, dieselben Faktoren wie in der *kreisler* Maus fehlen. Die *Nkx5-1* Expression in diesen Mutanten wurde in E9.5 Embryonen untersucht. Die unveränderte Aktivität des *Nkx5-1* Gens in den *Hoxa-1* Mutanten, läßt einerseits vermuten, daß das *Nkx5-1* Gen nicht durch aus dem Rhombomer 5 sezernierte Faktoren direkt reguliert wird, andererseits auch nicht in Signalkaskaden involviert ist, die im Rhombomer 5 ihren Ursprung haben.

Die *Nkx5-1* Expression wurde zusätzlich im Ohrvesikel von *plotch* Embryonen, die Mißbildungen des Innenohres aufgrund eines inkompletten Neuralrohrschlusses im sich entwickelnden Hinterhirn (Exencephalie) aufweisen, untersucht. In diesen Mutanten wird kein funktionsfähiges *Pax-3* Genprodukt hergestellt (Epstein et al., 1991). Das *Pax-3* Gen wird am E7.5 in den seitlichen Rändern der Neuralplatte und am E8.5 in den dorsalen Zellen des Neuralrohres exprimiert (Goulding et al., 1991). Der Ohrvesikel weist mit Beginn der epithelialen Bewegungen sichtbare Mißbildungen auf. Alle Strukturen des sich entwickelnden Innenohres sind deformiert und reduziert und auch ihre Lokalisation ist verändert (Deol, 1966). In den *plotch* Mäusen sind vermutlich von den *Hoxa-1* Mutanten verschiedene, die Innenohrentwicklung regulierende Molekülinteraktionen gestört. Es ist anzunehmen, daß hier die ohrinduzierenden/ohrbildenden Signale aus dem dorsalen Teil des Neuralrohres fehlen.

*In situ* Hybridisierungen in *plotch* Embryonen am E10.5 zeigten, daß die *Nkx5-1* Genaktivität auch nicht durch Hinterhirnsignale, wie sie in diesen Mutanten gestört sind, gesteuert wird. Es ist anhand der Daten auch ausgeschlossen, daß das *Pax-3* Gen, das in den der presumptiven Ohrregion angrenzenden, seitlichen Rändern der Neuralplatte exprimiert wird, *Nkx5-1* reguliert.

Möglich ist, daß die *Nkx5-1* Aktivität durch Hinterhirnsignale, welche mit diesen beiden Mausstämmen nicht erfaßt worden sind, gesteuert wird. Transplantationsexperimente an Hühnchen weisen jedoch ebenfalls darauf hin, daß die *Nkx5-1* Genaktivierung von Einflüssen aus dem sich entwickelnden Hinterhirn unabhängig ist (Herbrandt et al., 1998).

Möglicherweise wird das *Nkx5-1* Gen durch Faktoren aus dem Oberflächenektoderm, das im Plakodenstadium der Ohrregion seitlich angrenzt, aktiviert. Solche induktiven Signale sind bisher nicht nachgewiesen worden, wurden aber von Fekete (1996) im Hinblick auf eine Achsenspezifisierung des invaginierenden Ohrepithels diskutiert. Die sehr frühe Anschaltung des Gens in spezifischen Regionen der Ohrplakode (siehe Punkt 3.1.1.2) läßt außerdem die

Annahme zu, daß die Aktivatoren des *Nkx5-1* Gens noch vor der Bildung der Rhombomere wirken. Signalwege, durch welche das *Nkx5-1* Gen aktiviert wird, haben ihren Ursprung möglicherweise im Chordamesoderm. Das Chordamesoderm wandert am E7.0 unter das prospektive Ohrektoderm und sendet Signale, die die Formation der Ohrplakode induzieren (Fritsch et al., 1997). Ein mögliches "upstream Gen" von *Nkx5-1* könnte durch Faktoren aus dem Mesoderm angeschaltet werden und bei der Spezifizierung der Plakodenzellen aktiv sein. Ein solches, *Nkx5-1* regulierendes Gen, könnte auch durch neuronale Signale aktiviert werden, die im Entwicklungsstadium E7.0 planar über die Neuralplatte wirken (Gallagher et al., 1996).

Homozygote *plotch* Embryonen wurden ebenfalls auf eine mögliche Störung der Aktivität des *Pax-2* Gens untersucht. Diese Analyse war nicht nur hinsichtlich der Frage einer hinterhirnabhängigen *Pax-2* Expression im Innenohr von Interesse. Mäuse, in denen das *Pax-2* Gen inaktiviert ist, weisen dieselbe Exencephalie auf, wie die *Pax-3* Mutanten (Torres et al., 1996).

Hier wurde anhand von *Pax-2* Expressionsdaten in *plotch* E10.5 und E11.5 Embryonen gezeigt, daß *Pax-2* in der Ohranlage von Hinterhirnsignalen, wie sie in der *plotch* Mutante fehlen, unabhängig aktiv ist. Es wurde gleichsam eine Regulation des *Pax-2* Gens durch *Pax-3* im sich entwickelnden Hinterhirn ausgeschlossen.

#### **4.3.2 In homozygoten *plotch* Embryonen wandern keine Melanoblasten in die Ohranlage ein**

Die *Pax-3* Mutation bedingt neben den Neuralrohranomalien auch Defekte in zahlreichen Neuralleistenderivaten (Goulding et al., 1993). Dabei wird die Neuralrohranomalie und ein mögliches Fehlen der Neuralleiste den Defekten in den Neuralleistenderivaten nicht zwingend vorangestellt. Vielmehr wird diskutiert, daß das *Pax-3* Gen die Proliferation von Neuralleistenzellen oder deren Vorläufern reguliert (Tremblay et al., 1995). Es ist bekannt, daß in *Pax-3* Mutanten die Wanderung von Melanoblasten gestört ist. *Plotch* Mäuse, heterozygot für die *Pax-3* Mutation, weisen Pigmentstörungen im Fell auf.

Beim Menschen verursacht ein heterozygoter Defekt des *Pax-3* Gens das Waardenburg-Syndrom Typ 1. Dieses Krankheitsbild bedingt auch einen Hörverlust (Baldwin et al., 1992; Tassabehji et al., 1992), dessen Ursache bisher nicht bekannt ist. Neuerdings wird angenommen, daß ein Defekt in der Stria vascularis der Cochlea, der auf ein Fehlen von Melanozyten in dieser Struktur zurückgeführt wird, vorliegt (Steel et al., 1994).

Die Stria vascularis ist ein zur Produktion und Aufrechterhaltung des Ionengleichgewichts in der Endolymphe spezialisiertes Epithel im cochleären Gang, in welches auch Melanozyten aus der Neuralleiste einwandern. Die Funktion der Melanozyten in dieser Struktur ist nicht bekannt (Steel et al., 1994), allerdings wurde ein kausaler Zusammenhang zwischen dem

Fehlen von Melanozyten und einem gestörten endocochleären Potential beobachtet (Cable et al., 1994). Die Melanozyten sind zeitlebens für eine normale Funktion der Stria vascularis erforderlich und möglicherweise in einige Aspekte der Ionenpumpprozesse, die das endocochleäre Potential erzeugen, involviert (Steel et al., 1994). Ein Zusammenbruch des endocochleären Potentials bedingt einen Kollaps der Reissnerschen Membran und führt zu einem sekundären Verlust der Haarsinneszellen im Cortischen Organ (Steel et al., 1987; Schrott & Spoendlin, 1990). Ein Fehlen von Melanozyten in der Stria vascularis und der dadurch bedingte Degenerationsprozeß des Cortischen Organs könnte für die Taubheit der Menschen mit einem *Pax-3* Gendefekt verantwortlich sein.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels des Expressionsnachweises des *Trp-2* Gens überprüft, ob in homozygoten *plotch* Embryonen Melanoblasten in das Innenohr einwandern. Heterozygote *plotch* Mutanten wurden nicht untersucht, da diese keine Hörstörungen aufweisen. Das *Trp-2* Gen ist in die Melaninsynthese involviert und ist in Melanoblasten spezifisch aktiv (siehe Punkt 3.2.2.3). *Trp-2* Hybridisierungssignale markieren Melanoblasten, die aus der Neuralleiste auswandern oder im lokalen Neuroektoderm für die Bildung von Melanin determiniert worden sind. Im optischen Vesikel korrespondiert der Expressionsstart des *Trp-2* Gens am E9.5 nachweislich mit dem Zeitpunkt der Pigmentzellbestimmung im sich entwickelnden Auge. Da sich der optische Vesikel als eine Ausstülpung des Vorderhirns entwickelt, werden diese Melanoblasten, ihrem Ursprung nach, von den aus der Neuralleiste auswandernden Melanoblasten unterschieden. Der Unterschied im Ursprung der Melanoblasten diente als eindeutige Kontrolle für die *Trp-2* Hybridisierungen in *plotch* und Wildtyp Embryonen. Während das *Trp-2* Gen in Wildtyp Embryonen Melanoblasten im sich entwickelnden Innenohr, im Oberflächenektoderm und darunterliegendem, mesenchymalen Gewebe in vielen Regionen des Kopfes detektiert, werden in *plotch* Embryonen nur die prospektiven Pigmentzellen der Retina markiert. In *plotch* Mutanten findet keine Wanderung von Melanoblasten aus der prospektiven Neuralleistenregion in das Kopfektoderm, unterliegendes Mesenchym und das Innenohr statt. Die Funktion von Melanozyten, die in den vestibulären Teil des Innenohres einwandern, ist nicht bekannt. Es ist anzunehmen, daß diese Zellen auch hier an der Aufrechterhaltung des Ionengleichgewichts in der Endolymphe beteiligt sind. Da in den homozygoten *plotch* Mutanten die Melanozyten in allen Strukturen des sich entwickelnden Innenohres abwesend sind, müßte der Annahme nach das endolymphatische Potential des häutigen Labyrinths insgesamt gestört sein.

Die Folgen eines gestörten Ionengleichgewichts in der Endolymphe von cochleärem und vestibulärem Labyrinth werden durch die gezielte Inaktivierung des *isk* Gens veranschaulicht (Vetter et al., 1996). Das *isk* Gen codiert für ein Transmembranprotein, durch das Potassiumionen strömen (*isk* Kanal). Im Innenohr wird *isk* in den Marginalzellen der Stria vascularis und den vestibulären Dunkelzellen exprimiert und das Protein scheint hier dafür verantwortlich zu sein, hohe  $K^+$  Ionenkonzentrationen in die Endolymphe zu transportieren.

(Marcus & Shen, 1994; Wangemann, 1995). In den *isk*  $-/-$  Mäusen fehlt die transepitheliale Sekretion von Potassium. Im sich entwickelnden Innenohr bedingt dies eine Störung des Ionengleichgewichts in der Endolymphe des vestibulären und cochleären Apparates. Als Folge des gestörten Ionengleichgewichts kollabieren die Endothelien des gesamten Labyrinths und die Sinneszellen des vestibulären Apparates und der Cochlea degenerieren. Die Mausmutanten zeigen den typischen shaker/waltzer Phänotyp (Lyon et al., 1996; Steel, 1991).

In homozygoten *Pax-3* Mutanten müßten, vorausgesetzt, die Melanozyten haben im vestibulären Apparat dieselbe Funktion, wie in der Cochlea und die Mäuse würden zu adulten Tieren auswachsen, Degenerationsprozesse im vestibulären und cochleären Apparat stattfinden. Neben einem Hörverlust wäre auch ein gestörter Gleichgewichtssinn die Folge. In dem Krankheitsbild von Waardenburg Syndrom Typ 1 Patienten, die nur einen heterozygoten Defekt des *Pax-3* Gens aufweisen, werden keine Gleichgewichtsstörungen beschrieben. Es besteht einerseits die Möglichkeit, daß hier noch Melanozyten in den vestibulären Apparat einwandern. Andererseits, sollten die Zellen im vestibulären Epithel ebenfalls an der Bildung von Strukturen, die das Ionengleichgewicht regulieren, beteiligt sein, kann ihre Aufgabe hier möglicherweise von anderen Zellen übernommen werden.

#### **4.3.3 Die Expression vestibulär exprimierter Gene in der Gleichgewicht-Mausmutante *fidget***

Das Gen für die *fidget* Maus (Symbol *fi*) wurde 1943 als ein "Verhaltens-Gen" entdeckt (Grüneberg). Die Mäuse drehten sich im Kreis und zeigten eine Hyperaktivität, was eine Störung des Gleichgewichtssinnes annehmen ließ. Histologische Untersuchungen zeigten, daß die *fidget* Mutante Mißbildungen im vestibulären Apparat aufweist, hier sind die Vorgänge, die zur Ausbildung der Bogengänge führen, gestört (Truslove 1956). Das mutierte Gen wurde auf Chromosom 2 lokalisiert, konnte bisher allerdings nicht identifiziert werden (Carter, 1951; Steel, 1995).

In der *fidget* Mutante sind die grundlegenden Mechanismen der Bogengangsformation, in die epithelial-mesenchymale Interaktionen involviert sind (siehe Einleitung), gestört. Das Gen, dessen Mutation für den Phänotyp verantwortlich ist, muß daher zu Beginn der epithelialen Bewegungen im Ohrvesikel aktiv sein oder möglicherweise schon in der Ohrplakode exprimiert werden. Es ist anzunehmen, daß Zielgene des in *fidget* mutierten Gens im dorsalen Ohrepithel und umgebenden Mesenchym, schon am E10.5, in dem die Zellschicksale bereits festgelegt sind, aktiv sind.

Die spezifische Expression des *Nkx5-1* Gens in den Epithelien des vestibulären Apparates ließ vermuten, daß die *Nkx5-1* Genaktivität im Innenohr der *fidget* Mutante ebenfalls gestört

ist

Ausgeschlossen war zu Beginn der Analyse, daß das als *fidget* bezeichnete, mutierte Gen und das *Nkx5-1* Gen identisch sind, da das *Nkx5-1* Gen auf Mauschromosom 7 lokalisiert ist. Die sehr frühe Expression des *Nkx5-1* Gens am E8.5 in der Ohrplakode indizierte, daß das *fidget* Gen, wenn es in der die Bogengangsformation steuernden Signalkaskade "upstream" von *Nkx5-1* exprimiert würde, schon im 9 Somitenstadium in der Plakode oder in der presumptiven Ohrregion aktiv sein müßte. Bei zeitgleicher Expression wäre eine wechselseitige Regulation beider Gene in den epithelialen und mesenchymalen Geweben, die an der Ausbildung der vestibulären Strukturen beteiligt sind, ebenfalls möglich gewesen. Die Analyse zeigte jedoch, daß das *Nkx5-1* Gen in den *fidget* Mutanten generell unverändert exprimiert wird. Mit diesen Expressionsdaten ist auszuschließen, daß die *Nkx5-1* Genaktivität direkt oder auch indirekt, über zwischengeschaltete Moleküle, durch das *fidget* Genprodukt reguliert wird.

Interessanterweise zeigen *Nkx5-1* defiziente Mäuse (Hadrys et al., 1998) einen ähnlichen Innenohrphänotyp wie die *fidget* Mutanten, was daraufhin deutet, daß beide Gene in dieselben Prozesse involviert sind. Eine „upstream“ Funktion des *Nkx5-1* Gens ist dabei nahezu auszuschließen, da in *Nkx5-1* defizienten Mäusen Variabilitäten hinsichtlich der Ausprägung des Innenohrphänotyps zu beobachten sind, die in *fidget* Mutanten nicht auftreten. Möglicherweise existieren parallele, sich teilweise ergänzende Signalwege, die aber keine kompensatorische Funktion haben.

Von weiterem Interesse war es, herauszufinden, welche Moleküle an den epithelial-mesenchymalen Interaktionen, wie sie in der *fidget* Mutante gestört sind, beteiligt sind. Für den Transkriptionsfaktor *Msx-1*, der ab E9.0 im dorsalen Teil der Ohranlage - hier auch im Mesenchym, wie es bereits für Hühnchenembryonen publiziert worden ist (Wu & Oh, 1996) - aktiv ist, ist bereits eine Beteiligung an epithelial-mesenchymalen Interaktionen bei der Zahnmorphogenese nachgewiesen worden (Chen et al., 1996). Bei diesen Prozessen spielen induktive Wechselwirkungen mit *BMP4*, das der *TGF $\beta$*  Superfamilie angehört (Hogan, 1995), eine Rolle (Vainio et al., 1993; Monsoro-Burq et al., 1996). *BMP4* wird mit *Msx-1* überlappend auch im Mesenchym, um den dorsolateralen Teil des sich entwickelnden Innenohrs und im benachbarten Ohrvesikelepithel, das wahrscheinlich den Ursprung für die Ampullendächer gibt, die in der *fidget* Mutante fehlen, exprimiert (Oh et al., 1996). Die hier durchgeführte Expressionsanalyse zeigte, daß *Msx-1* in der *fidget* Mutante unverändert exprimiert wird. Diese Tatsache läßt einerseits vermuten, daß der *BMP4/Msx-1* Signalweg, wie er bei den epithelial-mesenchymalen Interaktionen der Zahnentwicklung eine Rolle spielt, an der Ausbildung des vestibulären Labyrinthes nicht beteiligt ist. Diese Hypothese wird gleichsam durch eine unveränderte *Msx-1* Expression in den *Nkx5-1* defizienten Mäusen, welche dieselben Innenohrstörungen aufweisen (siehe oben), gestützt (Hadrys et al., 1998). Andererseits besteht die Möglichkeit, daß ein solcher, möglicher Signalweg existiert, dieser aber in der *fidget* oder *Nkx5-1* Mutante nicht gestört ist. Interessanterweise werden *Msx-1* und *BMP4* auch in den Anlagen der sensorischen Epithelien des vestibulären

Apparates koexprimiert (Wu & Oh, 1996). Möglicherweise sind Interaktionen beider Gene in die Differenzierung der Cristae ampullaris involviert.

Es wurde im Rahmen dieser Analyse weiterhin ausgeschlossen, daß eine Störung der Expression des *FGFR2* Gens bei der Ausprägung des *fidget* Innenohrphänotyps eine Rolle spielt. Für einige Moleküle der *FGF/FGFR* Familie wurde bereits eine Funktion bei der Innenohrentwicklung beschrieben (Colvin et al., 1996; Mansour et al., 1993). Das *FGFR2* Gen, lokalisiert auf Maus-Chromosom 4, wird in zwei Splicevarianten, *bek* und *KGFR*, transkribiert. Diese Transkripte geben den Ursprung für zwei Rezeptoren mit unterschiedlicher Ligandenspezifität, deren detaillierte Verteilung im sich entwickelnden Innenohr bisher nicht bekannt ist. Hier wurde gezeigt, daß der für die Rezeptorvariante *bek* codierende Genbereich in Wildtyp E10.5 Embryonen im dorsalen Ohrvesikelepithel, das den Ursprung für die Bogengänge gibt, exprimiert wird. Die Transkripte sind in *fidget* Embryonen in unveränderter Verteilung nachweisbar und zeigen eine ungestörte Aktivität des *FGFR2* Gens in den Mutanten an. *Bek* bindet selektiv an den Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (*FGF-2*), welcher vermutlich eine Rolle bei der Differenzierung des Hörsinnesepithels der Cochlea spielt (Zheng et al., 1997). Interessanterweise wurde hier, in Korrelation mit den *FGF-2* Daten, eine zweite *bek*-Expressionsdomäne im ventralen, posterioren Ohrvesikelepithel, welches den Ursprung für die sensorischen Regionen der Cochlea gibt, detektiert. Es ist anzunehmen, daß der *bek* Rezeptor und dessen Ligand eine Funktion bei der Entwicklung des Cortischen Organs ausüben.

#### 4.4 Ein Innenohr *in vitro* Kultursystem zur Untersuchung der Funktion von Genen

Organkultursysteme vom Innenohr der Maus sind erstmals in den siebziger Jahren für morphologische Studien etabliert worden (Van De Water & Ruben, 1971). Es wurde gezeigt, daß in *in vitro* kultivierten Innenohren alle Strukturen angelegt werden und die Differenzierungsprozesse, die zur Ausbildung der Sinnesepithelien führen, dem *in vivo* Innenohr vergleichbar stattfinden. Ein solches System wurde insbesondere für ototoxische Studien entwickelt. Neuerdings wurden, zur Untersuchung der Funktion von Genen auch Innenohrorgankulturen von Hühnchenembryonen angelegt (Leon et al., 1995).

Hier wurde ein Maus-Innenohrorgankultursystem zur Untersuchung der Funktion innenohrspezifischer Gene etabliert. Ein Maussystem ist aus verschiedenen Gründen von Interesse. Es sind bereits viele Gene bekannt, die im Innenohr der Maus spezifisch exprimiert werden (siehe Einleitung und Punkt 4.2) und die eine essentielle Funktion bei der Ausbildung spezieller Strukturen des Innenohres ausüben (siehe Punkt 4.3). Zudem existieren zahlreiche Mausmutanten, die Defekte im Innenohr aufweisen. Die *in vitro* Kultivierung der geschädigten Ohranlagen von Mausmutanten ist, zur Aufklärung der Funktion von Molekülen, besonders hinsichtlich der Durchführung von "Rescueexperimenten" von

Interesse (Chen et al., 1996). "Rescueexperimente" können durch die Überexpression von Genen mittels der Injektion retroviralier Konstrukte in das kultivierte Gewebe (Kiernan & Fekete, 1997) oder durch Zugabe von Morphogenen zum Kulturmedium, unternommen werden. Für die Überexpressionsstudien werden Gene ausgewählt, die in den Innenohrstrukturen, die in der Mutante fehlerhaft ausgebildet werden, normalerweise aktiv sind und deren Aktivität in den geschädigten Innenohren gestört sein könnte. Von Van De Water wurde bereits 1991 mit der Kokultivierung von *kreisler* Otocysten und Wildtyp Hinterhirn eine Form von „Rescueexperimenten“ am sich entwickelnden Innenohr beschrieben.

Auf der Basis der Experimente der Arbeitsgruppe Van De Water ist hier ein modifizierbares Organkultursystem etabliert worden. Es zeigte sich, daß die Morphologie der kultivierten Innenohren, wie auch von Van De Water beobachtet (mündl. Mitteilung), variabel ist. Die Bogengänge, Ampullen, Utriculus, Sacculus und Cochlea werden angelegt, sind aber bezüglich der Form und Weite der Lumen unterschiedlich ausgebildet. Die Sinnesepithelien differenzieren *in vitro* und sind auch in den mit dem *in vivo* Innenohr korrespondierenden Positionen lokalisiert. Wie schon in der Einleitung beschrieben, sind epithelial-mesenchymale Interaktionen insbesondere in die Morphogenese des Innenohres involviert, wogegen die Zelldifferenzierung in den Anlagen der Sinnesepithelien von mesenchymalen Interaktionen unabhängig zu sein scheint (Swanson et al., 1990). Da bei den Otocystenpräparationen immer nur ein Teil des Mesenchyms mitexplantiert wird, könnte ein Fehlen von umgebendem Mesenchym die variable Morphologie bedingen.

Insgesamt gesehen eignet sich das Organkultursystem weniger für rein morphologische Studien zur Untersuchung der Ausbildung einzelner Strukturen des Innenohres. Die Zelldifferenzierungsprozesse in den Anlagen der Sinnesepithelien, können dagegen unter Berücksichtigung einer zeitlichen Entwicklungsverzögerung *in vitro* gut untersucht werden (Anniko et al., 1979). Sehr gut eignet sich das Organkultursystem für molekularbiologische Studien, die zur Untersuchung der Funktion und Regulation von Genen durchgeführt werden. Durch die Zugabe von Wachstumsfaktoren und Neurotrophen, für die ein proliferierender oder differenzierungsfördernder Effekt nachgewiesen werden konnte und deren Rezeptoren im sich entwickelnden Innenohr vorhanden sind (Bartheld & Rubel, 1991; Frenz et al., 1992; Mc Kay et al., 1996), kann auf die Morphologie, aber auch auf die Expression spezifischer Gene Einfluß genommen werden (Leon et al., 1996; Kioussi & Gruss, 1994; Zheng et al., 1997). Mittels dieser Manipulationen können Aussagen hinsichtlich der natürlichen Funktion dieser Faktoren, insbesondere der An- oder Abschaltung von Genen, bei der Innenohrentwicklung gemacht werden.

Die Expression ausgewählter Gene kann auch selektiv verändert und damit deren Einfluß auf die Differenzierungsprozesse im sich entwickelnden Innenohr analysiert werden. Beispielsweise wird durch die Zugabe von Antisense-Oligonukleotiden, welche sich an komplementäre Sequenzen der zellulären RNA anlagern, die Proteinsynthese spezifisch

blockiert (Foerst-Potts & Sadler, 1997; Stein & Cheng, 1993). Mittels eines retroviralen Konstruktes kann ein ausgewähltes Gen in bestimmten Strukturen des sich entwickelnden Innenohres zusätzlich exprimiert werden (Ektopische Expression). Der Retrovirus stellt dabei zum einen das Vehikel für die Infektion der Zielzellen dar, zum anderen gewährleistet er die Transkription des Gens (Kiernan & Fekete, 1997).

Von Interesse sind nicht nur die Auswirkungen solcher Genmanipulationen auf die Morphologie des Innenohres, sondern insbesondere, welche weiteren Moleküle in die Prozesse, die in dem *in vitro* kultivierten Innenohr modifiziert werden, involviert sind. In zusätzlich induzierten Innenohrstrukturen werden vermutlich spezifische Signalkaskaden, die zur Ausbildung dieser Struktur führen, in Gang gesetzt. Gene, die an diesen Prozessen beteiligt sind, können in den kultivierten Epithelien ein verändertes Expressionsmuster oder Expressionsniveau aufweisen.

Die Voraussetzung für die Analyse *in vitro* modifizierter Innenohrmorphogenese auf transkriptioneller Ebene ist, daß die Expression der untersuchten Gene in den von ihrer natürlichen Umgebung isolierten Innenohren, mit den in *in vivo* Innenohren detektierten Expressionsmustern, korreliert. In dieser Arbeit ist exemplarisch für die Gene *Nkx5-1*, *Nkx5-2*, *sek* und *Trp-2* gezeigt worden, daß diese Voraussetzung gegeben ist. Die *Nkx5* Gene sind im *in vitro* kultivierten Innenohr in den nicht sensorischen Epithelien des vestibulären Apparates unverändert aktiv, ebenso weist das *sek* Gen ein zum *in vivo* Innenohr identisches Expressionsmuster auf. Das *Trp-2* Gen, das im sich entwickelnden Innenohr spezifisch in den aus der Neuralleiste eingewanderten Melanoblasten exprimiert wird, ist ebenfalls *in vitro* aktiv. Hier konnte nach fünf Tagen Kultivierung nachgewiesen werden, daß die bei der Präparation in das Mesenchym eingeschlossenen Melanoblasten auch *in vitro* in das Innenohrepithel einwandern.

Die Inhibition der *Pax-2* Proteinsynthese in den *in vitro* kultivierten Innenohren wurde als erstes Experiment ausgewählt, die Innenohrentwicklung zu modifizieren. Eine Inhibition der *Pax-2* Translation ist bereits in *in vitro* Kulturen von Nierenanlagen mittels der Zugabe von Antisense-Oligonukleotiden erfolgreich durchgeführt worden (Rothenpieler & Dressler, 1993). Im Rahmen dieser Arbeit wurden, um die Eignung des Organkultursystems für diese Form von Experimenten zu testen, die *Pax-2* Antisense-Oligonukleotide verwendet. Die gezielte Inaktivierung des *Pax-2* Gens, das schon ab E9.0 im Epithel, das den Ursprung für die Cochlea gibt, exprimiert wird, hat die essentielle Funktion dieses Gens bei der Ausbildung der Cochlea gezeigt (siehe oben). Bei den hier durchgeführten Experimenten war zu erwarten, daß die Inhibition des *Pax-2* Gens *in vitro* Entwicklungsstörungen der Cochlea bedingt. Insbesondere die "späte" Funktion des Gens, das bis zur Geburt in spezifischen Strukturen des cochleären Ganges, aber auch in den Sinnesepithelien des Schweresinnesorgans, aktiv ist, sollte untersucht werden. Die Zugabe der *Pax-2* Sense und Antisense-Oligonukleotide bewirkte allerdings unspezifisch eine Hypertrophie des den Ohrvesikel umgebenden, chondrogenen Mesenchyms. Ein spezifischer Effekt, der aus einer Inhibition



der *Pax-2* Proteinsynthese resultiert, war nicht zu beobachten. Dies ist höchstwahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß die Oligonukleotide in den eingesetzten Konzentrationen nicht in das Epithel eindringen, wie durch Kontroll-Oligonukleotide indiziert wurde.

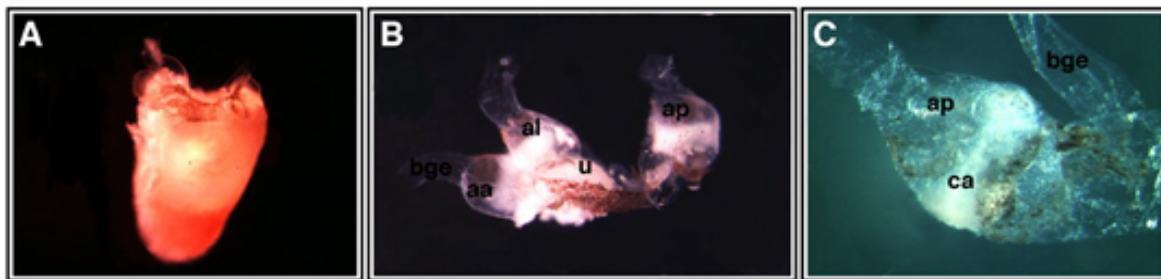
Der hypertrophe mesenchymale Effekt in den *in vitro* kultivierten Innenohren nahm mit steigender Oligonukleotidkonzentration im Kulturmedium zu. Die beobachtete Verengung der perilymphatischen Räume und des häutigen Labyrinths korrelierte mit dem Ausmaß der Hypertrophie und wurde als ein sekundärer Effekt interpretiert, welcher auf den durch das expandierte Mesenchym mangelnden Raum zurückzuführen ist. Möglich ist auch, daß durch eine Schädigung der mesenchymalen Zellen wesentliche epithelial-mesenchymale Interaktionen gestört sind. Letzteres ist bei starker Hypertrophie des Mesenchyms, welche eine mangelhafte Ausbildung der Sinnesepithelien bedingt, wahrscheinlich der Fall.

Der unspezifische, mesenchymale Effekt könnte durch Anhäufung von Oligonukleotid-Degradationsprodukten verursacht worden sein. Es ist bekannt, daß höhere Konzentrationen an Nukleotiden und/oder Nukleosiden sich auf die Proliferation und Differenzierung von Zellen auswirken können (Eckstein, 1985; Wagner, 1994). Die hier eingesetzten modifizierten Phosphorothioat-Oligodesoxynukleotide sollen jedoch eine höhere Nukleaseresistenz aufweisen und somit einer Degradation durch 3' Exonukleasen entgegenwirken. Ein ähnlicher, unspezifischer Effekt von Phosphorothioaten auf mesenchymale Zellen der Nierenanlage wurde etwa zeitgleich mit der oben beschriebenen *Pax-2* Inhibition in *in vitro* Studien von der Arbeitsgruppe Ekblom beobachtet (Durbeej et al, 1993). Möglicherweise bedingt die polyanionische Natur der Phosphorothioate, welche verstärkt zur unspezifischen Bindung von Proteinen führt, diesen Effekt (Sharma & Narayanan., 1995).

Zusammenfassend ist festzustellen, daß Phosphorothioat substituierte Oligonukleotide, für welche ein hypertropher Effekt auf mesenchymale Zellen festgestellt wurde, für *in vitro* Kulturen vom Innenohr, das von einer starken Schicht Mesenchym umgeben ist, nicht geeignet sind. Einerseits muß durch hohe zugegebene Oligonukleotidkonzentrationen das Eindringen der Moleküle in das Epithel gewährleistet werden, andererseits wirken sich die hohen Konzentrationen gleichsam unspezifisch auf das Mesenchym aus und verhindern weitere Morphogenese. In weiterführenden Experimenten müßten andere Techniken, wie zum Beispiel Injektionen zum Einsatz kommen, die gewährleisten, daß die modifizierenden Substanzen/Nukleotide in die gewünschten Regionen des kultivierten Organs gelangen. Die *in vitro* Kultivierung spezifischer Regionen des Otocysten wäre eine weitere Möglichkeit, das Eindringen der Moleküle in geringen Konzentrationen zu gewährleisten.

Zur Untersuchung von Zelldifferenzierungsprozessen wurden im Rahmen dieser Arbeit Epithelien der Bogengangsampullen aus E14.5 Embryonen *in vitro* kultiviert. In diesem System werden die Sinneszellen durch die Öffnung des Ampullendaches im Kulturmedium exponiert. Eine mikroskopisch sichtbare Weiterentwicklung der Sinnesepithelien bewies die Funktionsfähigkeit dieses Systems. Zudem war es möglich eine unveränderte Expression des *Nkx5-1* Gens in den kultivierten Epithelien mittels *in situ* Hybridisierung nachzuweisen.

Neben der Kultivierung embryonaler Sinnesepithelien zur Untersuchung von Differenzierungsprozessen sind *in vitro* Kulturen von Sinnesepithelien aus adulten Innenohren, an denen Untersuchungen zur Regeneration von Sinneszellen durchgeführt werden können (siehe unten), von besonderem Interesse. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Vorversuche zur Durchführung dieser Experimente unternommen. Die die Sinnesepithelien beherbergenden, epithelialen Hohlräume wurden zur Kultivierung aus dem adulten, verknöcherten Innenohr herauspräpariert (siehe Abb. 39) und deren Dächer zur Exposition der Sinneszellen im Kulturmedium geöffnet. Mikroskopische und histologische Analysen zeigten, daß diese Epithelien über drei Wochen erfolgreich kultiviert werden können.



**Abb. 39. (A) Herauspräpariertes Innenohr einer adulten Maus, bei dem auf der Ebene der Ampullen die Bogengänge abgebrochen sind und das ampulläre Epithel einschließlich der Cristae sichtbar wird. B zeigt isoliertes Innenohrepithel - die Ampullen des anterioren, lateralen und posterioren Bogenganges sind miteinander verbunden. (C) Isoliertes Ampullenepithel, das die Crista zeigt. (aa, al, ap) Ampulle des anterioren, lateralen, posterioren Bogenganges, (bge) Bogengangsepithel, (ca) Crista ampullaris, (u) Utriculus.**

Zusammenfassend, haben die hier durchgeführten *in vitro* Kultivierungsexperimente gezeigt, daß die Morphogenese und Zelldifferenzierung unter standardisierten Bedingungen die *in vivo* ablaufenden Prozesse widerspiegeln. Umsomehr scheint die genetische Kontrolle entsprechend der *in vivo* Situation zu verlaufen, wie durch Expressionsanalysen an *in vitro* kultiviertem Material eindeutig dokumentiert wurde. Somit können diese Experimente als Basis für weiterführende, funktionelle Untersuchungen direkt angewandt werden.

Als besonders interessant erscheinen in diesem Zusammenhang Kulturen von Sinnesepithelien, die eine direkte Einflußnahme auf die Zelldifferenzierungsprozesse erlauben. In solchen Kulturen, im Gegensatz zu Organkulturen können Wachstumsfaktoren und Antisense-Oligonukleotide oder virale Konstrukte, die die Differenzierungsprozesse möglicherweise manipulieren, das Sinnesepithel direkt erreichen. Mit der Durchführung solcher *in vitro* Kulturen konnte beispielsweise der proliferierende Effekt der Retinolsäure auf das Sinnesepithel der Cochlea, der in einer vermehrten Bildung von Haarzellen im Cortischen Organ resultiert, nachgewiesen werden (Kelley & Corwin, 1993; Levebvre et al., 1993). Für verschiedene Wachstumsfaktoren wurde ebenfalls ein mitogener Effekt auf die

Sinnesepithelien des sich entwickelnden Innenohres dokumentiert, so beispielsweise für TGF- $\alpha$ , EGF (Lambert, 1994; Yamashita & Oesterle, 1995), IGF and FGF-2 (Zheng et al., 1997).

Es ist anzunehmen, daß in den modifizierten Epithelien Gene spezifisch angeschaltet werden und damit über das Schicksal der Zellen entscheiden. Die Untersuchung der Expressionsmuster bekannter Gene in den modifizierten Epithelien kann zum einen darüber Aufschluß geben, in welchen Teil des Entwicklungsprozesses diese Gene involviert sind, zum anderen in welche Signalkaskaden ihre Aktivität eingeordnet werden kann.

Die Aktivität von Wachstumsfaktoren und die Ausbildung der entsprechenden Rezeptoren im sich entwickelnden Innenohr *in vivo*, insbesondere in den differenzierenden Sinnesepithelien, wurde bereits dokumentiert (Mansour et al., 1993; Orr-Utreger et al., 1993; Peters et al., 1993; Pirvola et al., 1995; Wilkinson et al., 1989; Zheng et al., 1997).

In engem Zusammenhang mit den Differenzierungsprozessen im Innenohr während der Embryonalentwicklung steht die Regeneration von Zellen im adulten Innenohr. Das Interesse gilt hier den Sinnesepithelien des Hör- und Gleichgewichtapparates, die für postnatale Schädigungen durch Traumata, Abnutzung und Toxine anfällig sind und deren Funktionsverlust zu Gleichgewichtsstörungen und Taubheit führen. Im Gegensatz zu den Haarzellen der Cochlea, die spontan keine Regeneration zeigen, regenerieren Haarzellen des Vestibularorgans selbst in adulten Organismen spontan (Forge et al., 1993). Es ist anzunehmen, daß bei Regenerationsprozessen Gene, die in der Embryonalentwicklung bei der Differenzierung des Innenohres eine Rolle spielen, erneut angeschaltet werden.

Zur Untersuchung einer Reexpression embryonal exprimierter Gene während der Regeneration von Sinneszellen, können reife, sich nicht mehr teilende Sinnesepithelien in *in vitro* Kultur genommen und hier zwecks einer Regeneration selektiv geschädigt werden (Warchol et al., 1993).

## 5. Literatur

**Acampora, D., Mazan, S., Avantaggiato, V., Barone, P., Tuorto, F., Lallemand, Y., Brulet, P. and Simeone, A. (1996).** Epilepsy and brain abnormalities in mice lacking *Otx 1* gene. *Nat. Gen.* 14. 218-222.

**Agrawal, S., Mayrahd, S. H., Zamecnik, P. C. and Pederson, T. (1990).** Site-specific excision from RNA by RNase H and mixed phosphate-backbone oligodeoxynucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1401-1405.

**Akam, M. (1989).** Hox and HOM: Homologous gene clusters in insects and vertebrates. *Review. Cell* 87. 347-349.

**Akimenko, M. A., Ekker, M., Wegner, J., Lin, W. and Westerfield, M. (1994).** Combinatorial expression of three zebrafish genes related to *distal-less*: part of a homeobox gene code for the head. *J. Neurosci.* 14(6). 3475-3486.

**Auerbach, R. (1954).** *J. Exp. Zool.* 127. 305.

**Anniko, M., Nordemar, H. and Van De Water, T. R. (1979).** Embryogenesis of the inner ear. *Arch. Otorhinolaryngol.* 224. 285-299.

**Augustine, K., Liu, E. T. and Sadler, T. W. (1993).** Antisense inhibition of *engrailed* genes in mouse embryos reveals roles for these genes in craniofacial and neural tube development. *Teratology* 51. 300-310.

**Baldwin, C. T., Hoth, C. F., Amos, J. A., da Silva, E. O. and Milunsky, A. (1992).** An exonic mutation in the *HuP2* paired domain gene causes Waardenburg's syndrome. *Nature* Vol 355. 637-638.

**Balling, R., Deutsch, U. and Gruss, P. (1988).** Undulated, a mutation affecting the development of the mouse skeleton has a point mutation in the paired box of *Pax-1*. *Cell* 55. 531-535.

**Bancroft, J. D. and Stevens, A. (1990).** Theory and practice of histological techniques. Churchill Livingstone, 3rd edition.

**Bartheld, C. S. and Rubel, E. W. (1991).** Expression of nerve growth factor receptors in the developing inner ear of chick and rat. *Dev.* 113, 455 - 470.

**Bavik, C., Wark, S. J. and Chambon, P. (1996).** Development abnormalities in cultured mouse embryos deprived of retinoic acid by inhibition of yolk sac retinol binding protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93. 3110-3114.

**Bedell, M. A., Jenkins, N. A. and Copeland, N. G. (1997).** Mouse models of human disease. Part I: Techniques and resources for genetic analysis in mice. *Gen. & Dev.* 11. 1-10.

**Bernd, P. and Represa, J. (1989).** Characterisation and localization of nerve growth factor receptors in the embryonic otic vesicle and cochleovestibular ganglion. *Dev. Biol.* 134. 11-20.

**Bober, E., Baum, C., Braun, T. and Arnold, H. H. (1994).** A novel NK - related mouse homeobox gene: expression in central and peripheral nervous structures during embryonic development. *Dev. Biol.* 162. 288 - 303.

- Bober, E., Franz, T., Atnold, H.-H., Gruss, P. and Tremblay, P. (1994).** *Pax-3* is required for the development of the limb muscles: A possible role for the migration of dermomyotomal muscle progenitor cells. *Dev.* 120. 603-612.
- Cable, J., Huszar, D., Jaenisch, R. and Steel, K. P. (1994).** Effects of mutations at the *W* locus (*c-kit*) on inner ear pigmentation and function in the mouse. *Pigment cell research* 7. 17-32.
- Cable, J., Jackson, I. J., Steel, K. P. (1995).** Mutations at the *W* locus affect survival of neural crest-derived melanocytes in the mouse. *MOD* 50. 139-150.
- Carter, T. C. (1951).** The position of fidget in linkage group V of the house mouse. *J. Gen.* 50. 264-267.
- Chen, Y., Bei, M., Woo, I., Satokata, I. and Maas, R. (1996).** *Msx1* controls inductive signaling in mammalian tooth morphogenesis. *Dev.* 122. 3035-3044.
- Chisaka, O., Musci, T. S. and Capecchi, M. R. (1992).** Developmental defects of the ear, cranial nerves and hindbrain resulted from targeted disruption of the mouse homeobox gene *Hox-1.6*. *Nature* 355. 516-520.
- Colvin, J. S., Bohne, B. A., Harding, G. W., Mc Ewen, D. G. and Ornitz, D. M. (1996).** Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3. *Nat. Gen.* Vol 12. 390-397.
- Copp, A. J. (1995).** Death before birth: clues from gene knockouts and mutations. *Trends Genet.* 11.87-93.
- Cordes, S. P. and Barsh, G. S. (1994).** The mouse segmentation gene *kr* encodes a novel basic domain-leucine zipper transcription factor. *Cell*, Vol 79. 1025-1034.
- Davidson, D. (1995).** The function and evolution of *Msx* genes: pointers and paradoxes. *TIG* Vol. 11, No. 10. 405-411.
- Davis, C. A. and Joyner, A. L. (1988).** Expression patterns of the homeobox containing gene *En-1* and *En-2* and the proto-oncogene *int-2* diverge during mouse development. *Genes & Dev.* 2. 1736-1744.
- Deitcher, D. L., Fekete, D. M. and Cepko, C. L. (1994).** Asymmetric expression of a novel homeobox gene in vertebrate sensory organs. *J. Neurosci.* 14. 486-498.
- Deol, M. S. (1954).** The anomalies of the labyrinth of the mutants varitint-waddler, shaker-2 and jerker in the mouse. *J. Genet.* 52. 562-588.
- Deol, M. S. (1964).** The abnormalities of the inner ear in *kr* mice. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 12. 475 - 490 und 727.
- Deol, M. S. (1966).** Influence of the neural tube on the differentiation of the inner ear in the mammalian embryo. *Nature*.5019. S. 219.
- Deol, M. S. (1983).** In: Development of auditory and vestibular systems. Edited by R. Romand. Acad. Press. 309-333.
- Detwiler, S. R. and Van Dyke, R. H. (1951).** *J. Exp. Zool.* 118. 389.
- Dohlman, G. F. (1964).** Secretion and absorption of the endolymph. *Annals of Otol. Rhinol and Laryngol.* 73. 708-723.

- Dressler, G. R., Deutsch, U., Chowdhury, K., Nornes, H. O. and Gruss, P. (1990).** *Pax2*, a new murine paired-box-containing gene and its expression in the developing excretory system. *Dev.* 109. 787 - 795.
- Durbeej, M., Söderström, S., Ebendal, T., Birchmeier, C. and Ekblom, P. (1993).** Differential expression of neurotrophin receptors during renal development. *Dev.* 119. 977-989.
- Eckstein, F. (1985).** Nucleoside phosphorothioates. *Annu. Rev. Biochem.* 54. 367-402.
- Ekker, M., Akimenko, M.-A., Bremiller, R. and Westerfield, M. (1992).** Regional expression of three homeobox transcripts in the inner ear of zebrafish embryos. *Neuron* Vol. 9. 27-35.
- Epstein, D. J., Vekemans, M. and Gros, P. (1991).** *Spotch*, a mutation affecting development of the mouse neural tube, shows a deletion within the paired homeodomain of *Pax-3*. *Cell* 67, 767 - 774.
- Erkman, L., Mc Evilly, R., Luo, L., Ryan, A., Hooshmand, F., Connell, S. M., Keithley, E. M., Rapaport, D. H., Ryan, A. F. and Rosenfeld, M. G. (1996).** Role of transcription factors *Brn-3.1* and *Brn-3.2* in auditory and visual system development. *Nature* Vol 381. 603-606.
- Fekete, D. M. (1996).** Cell fate specification in the inner ear. *Curr. Opinion in Neurobiol.* 6. 533-541.
- Foerst-Potts, L. and Sadler, T. W. (1997).** Disruption of *Msx-1* and *Msx-2* reveals roles for these genes in craniofacial, eye and axial development. *Dev. Dyn.* 209. 70-84.
- Forge, A., Li, L., Corwin, J. and Nevill, G. (1993).** Ultrastructural evidence for hair cell regeneration in the mammalian inner ear. *Science* Vol. 259. 1616-1619.
- Franz, T. (1989).** Persistent truncus arteriosus in the *spotch* mutant mouse. *Anat. Embryol.* 180.457-464.
- Frenz, D. A. and Van De Water T. R. (1991).** Epithelial control of periotic mesenchyme chondrogenesis. *Dev. Biol.* 144. 38-46.
- Frenz, D. A., Galinovic-Schwartz, V., Liu, W., Flanders, K. C., Van De Water, T. R. (1992).** Transforming growth factor  $\beta 1$  is an epithelial - derived signal peptide that influences otic capsule formation. *Dev. Biol.* 153, 324 - 336.
- Fritzsche, B., Barald, K. F. and Lomax, M. I. (1997).** Early embryology of the vertebrate ear. In: *Development of the auditory system* (eds E. W. Rubel, A. N. Popper, R. R. Fay). Springer handbook of auditory research Vol. XII. New York: Springer. 80-145.
- Frohman, M. A., Martin, G. R., Cordes, S. P., Halamek, L. P. and Barsh, G. S. (1993).** Altered rhombomere-specific gene expression and hyoid bone differentiation in the mouse segmentation mutant, *kreisler* (*kr*). *Dev.* 117. 925-936.
- Gallagher, B. C., Henry, J. J. and Grainger, R. M. (1996).** Inductive processes leading to inner ear formation during *Xenopus* development. *Dev. Biol.* 175. 95-107.
- Gehring, W. J. (1987).** Homeoboxes in the study of development. *Science* 236. 1245-1251.
- Gibson, F., Walsh, J., Mburu, P., Varela, A., Brown, K. A., Antonio, M., Beisel, K. W., Steel, K. P. and Brown, S. D. M. (1995).** A type VII myosin encoded by the mouse deafness gene *shaker 1*. *Nature* Vol 374. 62 - 64.

- Givol, D. and Yayon, A. (1992).** Complexity of FGF receptors: Genetic basis for structural diversity and functional specificity. *FASEB J.* 6. 3362-3368.
- Goulding, M. D., Chalepakis, G., Deutsch, U., Erselius, J. and Gruss, P. (1991).** *Pax-3*, a novel murine DNA binding protein expressed during early neurogenesis. *EMBO J.* 10. 1135-1147.
- Goulding, M., Sterrer, S., Fleming, J., Balling, R., Nadeau, J., Moore, K., Brown, S. D. M., Steel, K. P. and Gruss, P. (1993).** Analysis of the *Pax-3* gene in the mouse mutant *splotch*. *Genomics* 17. 355-363.
- Grüneberg, H. (1943).** Two new mutant genes in the house mouse. *J. Genet.* 45. 22-28.
- Gruss, P. and Walther, C. (1992).** Review. *Pax* in Development. *Cell Vol* 69. 719-722.
- Halder, G., Callaerts, P. and Gehring, W. J. (1995).** Induction of ectopic eyes by targeted expression of the *eyeless* gene in *Drosophila*. *Science* 267. 1788-1792.
- Hadrys, T., Braun, T., Rinkwitz-Brandt, S., Arnold, H.H. and Bober, E. (1998).** *Nkx5-1* gene inactivation in the mouse causes morphogenetic defects in the inner ear and abnormal circling behaviour. *Development* 125. 33-39.
- Herbrand, H., Guthrie, S., Hadrys, T., Hoffmann, S., Rinkwitz-Brandt, S., Arnold, H.H. and Bober, E. (1997).** The chick *cNkx5.1* gene is a target for inductive signals from hindbrain during inner ear development. *Development*, in press.
- Hertwig, P. (1944).** Die Genese der Hirn- und Gehörorganmißbildungen bei röntgenmutierten Kreisler-Mäusen. *Z. Konstlehere* 28. 327-354.
- Hill, R. E., Jones, P. F., 'Rees, A. R., Sime, C. M., Justice, M. J., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Graham, E. and Davidson, D. R. (1989).** A new family of mouse homeobox containing genes: molecular structure, chromosomal location and developmental expression of *Hox-7.1*. *Gen. & Dev.* 3. 26-37.
- Hill, R. E., Favoar, J., Hogan, B. L. M., Ton, C. C. T., Saunders, G. F., Hanson, I. M., Prosser, J., Jordan, T., Hastie, N. D. and Van Heyningen, V. (1991).** Mouse small eye results from mutations in a paired-like homeobox containing gene. *Nature* 354. 522-525.
- Hinrichsen, K. V. (1990).** Humanembryologie. Springer Verlag, 1. Auflage.
- Hogan, B. L. M. (1996).** Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Gen. & Dev.* 10. 1580-1594.
- Holland, P., Ingham, P. and Krauss, S. (1992).** Mice and flies head to head. *Nature* 358. 627-628.
- Hunt, P., Wilkinson, D. and Krumlauf, R. (1991).** Patterning in the vertebrate head: Murine *Hox-2* genes mark distinct subpopulations of premigratory and migratory cranial neural crest. *Cev.* 112. 43-50.
- Kelley, M. W. and Corwin, J. T. (1993).** The developing organ of corti contains retinoic acid and forms supernumerary hair cells in response to exogenous retinoic acid in culture. *Development* 119, 1041 - 1053.
- Kessel, M. and Gruss, P. (1991).** Homeotic transformations of murine vertebrae and concomitant alteration of Hox codes induced by retinoic acid. *Cell* 67. 89-104.

- Kiernan, A. E. and Fekete, D. M. (1997).** In vivo gene transfer into the embryonic inner ear using retroviral vectors. *Audio. Neurotol.* 2. 12-24..
- Kiernan, A. E., Nunes, F., Wu, D. K. and Fekete, D. M. (1997).** The expression domain of two related homeobox genes defines a compartment in the chicken inner ear that may be involved in semicircular canal formation. *Dev. Biol.* 191. 215-229.
- Kim, Y. and Nierenberg, M. (1989).** Drosophila NK homeobox genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86. 7716-7720.
- Kimura, R., Lunquist, P. G. and Wersall, J. (1963).** Secretory linings in the ampullae of the guinea pig labyrinth. *Acta Otolaryngol.* 57. 517-530.
- Kioussi, C. and Gruss, P. (1994).** Differential induction of *Pax* genes by NGF and BDNF in cerebellar primary cultures. *Journ. of Cell Biol.* Vol 125. 417-425.
- Kornberg, T. B. and Tabata, T. (1993).** Segmentation of the Drosophila embryo. *Curr. Biol.* Ltd ISSN 0959-437 X. 585-593.
- Krumlauf, R. (1994).** *Hox* genes in vertebrate development. Review. *Cell* Vol. 78. 191-201.
- Lambert, P. R. (1994).** Inner ear hair cell regeneration in a mammal: identification of a triggering factor. *Laryngoscope* 104. 701-717.
- Lawrence, P. A. and Morata, G. (1994).** Homeobox genes: their function in Drosophila segmentation and pattern formation. *Cell* Vol. 78. 181-189.
- Lawrence, P. A. and Struhl, G. (1996).** Morphogens, compartments and pattern: lessons from Drosophila? *Cell* 85. 951-961.
- Lefebvre, P. P., Malgrange, B., Staecker, H., Moonen, G. and Van De Water, T. R. (1993).** Retinoic acid stimulates regeneration of mammalian auditory hair cells. *Science*, Vol. 260. 692-694.
- Leon, Y., Sanchez, J. A., Miner, C., Ariza-Mc Naughton, L., Represa, J. J. and Giraldez, F. (1995).** Developmental regulation of Fos protein during proliferative growth of the otic vesicle and its relation to differentiation induced by retinoic acid. *Dev. Biol.* 167. 75-86.
- Leppert, M. and Richard, A. L. (1991).** Human genetic mapping and inherited deafness syndromes. *Ann. N. Y. Sci.* 630, 38.
- Li, C. W., Van De Water, T. R. and Ruben, R. J. (1978).** The fate mapping of the eleventh and twelfth day mouse otocyst: an in vitro study of the sites of origin of the embryonic inner ear sensory structures. *J. Morph.* 157, 249 - 268.
- Loke, S. L., Stein, C. A., Zhang, X. H., Mori, K., Nakarishi, M. Subasinghe, C., Cohen, J. S., and Neckers, L. M. (1989).** Characterisation of oligonucleotide transport into living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86. 3474-3478.
- Lufkin, T., Dierich, A., Le Meur, M., Mark, M. and Chambon P. (1991).** Disruption of the *Hox-1.6* homeobox gene results in defects in a region corresponding to its rostral domain of expression. *Cell* 66. 1105-1119.
- Lumsden, A. and Krumlauf, R. (1996).** Patterning the vertebrate neuraxis. *Science* Vol. 274. 1109-1116.
- Lyon, M., Rastan, S. and Brown, S. D. M. (1996).** Genetic variants and strains of the laboratory mouse (New York: Oxford press)



- Lyons, I., Parsons, L. M., Hartly, R. I., Andrews, J. E., Robb, L. and Harvey, R. P. (1995).** Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeobox gene *Nkx2-5*. *Gen. & Dev.* 9. 1654 - 1666.
- Mansour, S. L., Goddard, J. M. and Capecchi, M. R. (1993).** Mice homozygous for a targeted disruption of the proto oncogene *int-2* have developmental defects in the tail and inner ear. *Dev.* 117. 13-28.
- Marcus, D. C. and Shen, Z. (1994).** Slowly activating voltage dependent K<sup>+</sup> conductance is apical pathway for K<sup>+</sup> secretion in vestibular dark cells. *Am J. Physiol.* 267. C857-864.
- Mark, M., Lufkin, T., Vonesch, J.-L., Ruberte, E., Olivo, J.-C., Dolle, P., Gorry, P., Lumsden, A. and Chambon, P. (1993).** Two rhombomeres are altered in *Hoxa-1* mutant mice. *Dev.* 119. 319-338.
- Martin and Sawanson (1993).** Descriptive and experimental analysis of the epithelial remodellings that control semicircular canal formation in the developing mouse inner ear. *Dev. Biol.* 159, 549 - 558.
- Martinez, P. and Davidson, E. H. (1997).** *SpHmx*, a sea urchin homeobox gene expressed in embryonic pigment cells. *Dev. Biol.* 181. 213-222.
- McGinnis, W. and Krumlauf, R. (1992).** Homeobox genes and axial patterning. *Cell* 68. 283-302.
- Mc Kay, I. J., Muchamore, L., Krumlauf, R. Maden, M., Lumsden, A. and Lewis, J. (1994).** The kreisler mouse: a hindbrain segmentation mutant that lacks two rhombomeres. *Dev.* 120. 2199-2211.
- Mc Kay, I. J., Lewis, J. and Lumsden, A. (1996).** The role of FGF-3 in ealy inner ear development: an analysis in normal and kreisler mutant mice. *Dev. Biol.* 174. 370-378.
- Miki, T., Bottaro, D. P., Fleming, T. P., Smith, C. L., Burgess, W. L., Chan, A. M.-L. and Aaronson, S. A. (1992).** Determination of ligand-binding specificity by alternative splicing: Two distinct growth factor receptors encoded by a single gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89. 246-250.
- Moase, C. E. and Trasler, D. G. (1989).** Spinal ganglia reduction in the *plotch*-delayed mouse neural tube defect mutant. *Teratology* 40. 67-75
- Moase, C. E. and Trasler, D. G. (1990).** Delayed neural crest emigration from *Sp* and *Sp<sup>d</sup>* mouse neural tube explants. *Teratology* 42. 171-182.
- Monsoro-Burq, A.-H., Duprez, D., Watanabe, Y., Bontoux, M., Vincent, C., Brickell, P. and Le Douarin, N. (1996).** The role of bone morphogenetic proteins in vertebral development. *Dev.* 122. 3607-3616.
- Murphy, P., Davidson, D. R. and Hill, R. E. (1989).** Segment-specific expression of a homeobox-containing gene in the mouse hindbrain. *Nature* 341. 156-159.
- Nadeau, J. H., Kosowsky, M. and Steel, K. P. (1991).** Comparative gene mapping, genome duplication and the genetics of hearing. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 630. 49-67.
- Nieto, A. Gilardi-Hebenstreit, P. Charnay, P. and Wilkinson, D. G. (1992).** A receptor protein tyrosine kinase implicated in the segmental patterning of the hindbrain and mesoderm. *Development* 116. 1137-1150.

- Nishimura, A. (1990).** A rapid highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acid Res.* 18. 6169.
- Nornes, H. O., Dressler, G. R., Knapik, E. W., Deutsch, U. and Gruss, P. (1990).** Spatially and temporally restricted expression of *Pax-2* during murine neurogenesis. *Dev.* 109. 797-809.
- Oh, S.-H., Johnson, R. and Wu, D. K. (1996).** Differential expression of Bone Morphogenetic Proteins in the vestibular and auditory sensory organs. *Journ. of Neurosc.* 16 (20). 6463-6475.
- Orr-Utreger, A., Givol, D., Yayon, A., Yarden, Y. and Lonai, P. (1991).** Developmental expression of two murine fibroblast growth factor receptors, *flg* and *bek*. *Development* 113. 1419-1434.
- Orr-Urtreger, A., Bedford, M. T., Burakova, T., Arman, E., Zimmer, Y., Yayon, A., Givol, D. and Lonai, P. (1993).** Developmental localization of the splicing alternatives of Fibroblast Growth Factor Receptor-2 (FGFR2). *Dev. Biol.* 158. 475-486.
- Ott, T., Kaestner, K. H., Monaghan, A. P. and Schütz, G. (1996).** The mouse homolog of the region specific homeotic gene *spalt* of *Drosophila* is expressed in the developing nervous system and in mesoderm-derived structures. *MOD* 56. 117-128.
- Peters, K., Werner, S. and Williams, L. (1993).** Unique expression pattern of the *FGF receptor 3* gene during mouse organogenesis. *Dev. Biol.* 155. 423-430.
- Pirvola, U., Cao, Y., Oellig, C., Suoqiang, Z., Pettersson, R. F. and Ylikowski, J. (1995).** The site of action of neuronal acidic fibroblast growth factor is the organ of corti of the rat cochlea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92. 9269-9273.
- Price, M., Lazzaro, D., Pohl, T., Mattei, M.-G., Ruther, U., Olivo, J.-C., Douboule, D. and Lauro, R. (1992).** Regional expression of the homeobox gene *Nkx-2.2* in the developing mammalian forebrain. *Neuron* 8. 241-255.
- Qin, F. and Kirby, M. (1995).** *Int-2* influences the development of the Nodose ganglion. *Pediatric Research*, Vol. 38, No. 4. 485-492.
- Represa, J. and Bernd, P. (1989).** Nerve growth factor and serum differentially regulate development of the embryonic otic vesicle and cochleovestibular ganglion in vitro. *Dev. Biol.* 134, 21 - 29.
- Rinkwitz-Brandt, S., Justus, M., Oldenettel, I., Arnold, H. H. and Bober, E. (1995).** Distinct temporal expression of mouse *Nkx-5.1* and *Nkx-5.2* homeobox genes during brain and ear development. *Mech. Dev.* 52. 371-381.
- Rothenpieler, U. W. and Dressler, G. R. (1993).** *Pax-2* is required for mesenchyme-to-epithelium conversion during kidney development. *Dev.* 119. 711-720.
- Rugh, R. (1990).** The Mouse: Its reproduction and development. Oxford University press, Oxford.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis T. (1989).** Molecular cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.
- Sanford, L. P., Ormsby, I., Gittenberger-de Groot, A. C., Sariola, H., Friedman, R., Boivin, G. P., Cardell, E. L. and Doetschman, T. (1997).** *TGF $\beta$ 2* knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other *TGF $\beta$*  knockout phenotypes. *Dev.* 124. 2659-2670.

- Sharma, H. W. and Narayanan, R. (1995).** The therapeutic potential of antisense oligonucleotides. *Bio Essays* Vol. 17, No. 12. 1055-1063.
- Sher, A. (1971).** The embryonic and postnatal development of the inner ear of the mouse. *Acta Oto - Laryngol.*, Suppl. 285.
- Schrott, A. and Spoendlin, H. (1987).** Pigment anomaly-associated inner ear deafness. *Acta Otolaryngol.* 103. 451-457.
- Simeone, A., Acampora, D., Mallamaci, A., Stornaiuolo, A., Dapice, M. R., Nigro, V. and Boncinelli, E. (1993).** A vertebrate gene related to *orthodenticle* contains a homeodomain of the *bicoid* class and demarcates anterior neuroectoderm in the gastrulating mouse embryo. *EMBO J.* 12. 2735-2747.
- Srivastava, D., Cserjesi, P. and Olson, E. N. (1995)** A subclass of bHLH proteins required for cardiac morphogenesis. *Science*, Vol. 270. 1995-1999.
- Stadler, H. S., Murray, J. C., Leysens, N. J., Goodfellow, P. J. and Solursh, M. (1995).** Phylogenetic conservation and physical mapping of members of the H6 homeobox family. *Mammalian Genome* 6. 383-388.
- Steel, K. P., Barkway, C. and Bock, G. R. (1987).** Strial dysfunction in mice with cochleo-saccular abnormalities. *Hearing Research* 27. 11-26.
- Steel, K. P. (1991).** Similarities between mice and humans with hereditary deafness. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 630. 69-79
- Steel, K. P., Davidson, D. R. and Jackson, I. J. (1992).** *Trp-2/DT*, a new early melanoblast marker, shows that steel growth factor (c-kit ligand) is a survival factor. *Development* 115. 1111 - 1119.
- Steel, K. P. and Brown, S. D. M. (1994).** Genes and deafness. *TIG* Vol 10, No. 12. 28-435.
- Steel, K. P. (1995).** Inherited hearing defects in mice. *Annu. Rev. Genetics* 29. 675-701.
- Stein, C. A. and Cheng, Y. C. (1993).** Antisense oligonucleotides as therapeutic agents - Is the bullet really magical? *Science* 261. 1004-1012.
- Stein, S., Fritsch, R., Lemaire, L. and Kessel, M. (1996).** Checklist: vertebrate homeobox genes. *Mech. Dev.* 55. 91-108.
- Suzuki, H. R., Padanilam, B. J., Vitale, E., Ramirez, F. and Solursh, M. (1991).** Repeating developmental expression of *G-Hox 7*, a novel homeobox containing gene in the chicken. *Dev. Biol.* 148.375-388.
- Swanson, G. J., Howard, M. and Lewis, J. (1990).** Epithelial autonomy of the inner ear of a bird embryo. *Dev.* 137. 243-257.
- Tassabehji, M., Read, A. P., Newton, V. E., Harris, R., Balling, R., Gruss, P. and Strachan, T. (1992).** Waardenburg's syndrome patients have mutations in the human homologue of the *Pax-3* paired box gene. *Nature* Vol. 355. 635-636.
- Thews, G, Mutschler, E. and Vaupel, P. (1989).** Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen. Wissenschaftl. Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.
- Torres, M., Gomez-Pardo, E. and Gruss, P. (1996).** *Pax-2* contributes to inner ear patterning and optic nerve trajectory. *Dev.* 122. 3381-3391.

- Tremblay, P., Kessel, M. and Gruss, P. (1995).** A transgenic neuroanatomical marker identifies cranial neural crest deficiencies associated with the *Pax-3* mutant *shotch*. *Dev. Biol.* 171. 317-329.
- Truslove, G. M. (1956).** The anatomy of the development of the fidget mouse. *J. Genet.* 54, 64 - 86.
- Tsukamoto, K., Jackson, I. J., Urabe, K., Montague, P. and Hearing, V. (1992).** A second tyrosine-related protein *Trp-2* maps to and is mutated at the mouse *slaty* locus. *Embo* 11. 519 - 526.
- Vainio, S., Karanova, I., Jowett, A. and Theleff, I. (1993).** Identification of BMP4 as a signal mediating secondary induction between epithelial and mesenchymal tissues during early tooth development. *Cell* 75. 5-58.
- Van De Water, T. R. and Ruben, R. J. (1971).** Organ culture of the mammalian inner ear. *Acta Otolaryngol.* 71.303-312.
- Van De Water, T. R. (1973).** Development of the sensory structures in organ cultures of the twelfth and thirteenth gestation day mouse embryo inner ears. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 82. Suppl. 4. 1-18.
- Van De Water, T. R. and Ruben, R. J. (1974).** Growth of the inner ear in organ culture. Meeting of the American Otol. Soc., Florida. April, 21-22.
- Van De Water, T. R. and Represa, J. (1991).** Tissue interaction and growth factors that control development of the inner ear. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 630, 116 - 128.
- Varela-Nieto, I., Represa, J., Avila, M. A., Miner, C., Mato, J. M and Giraldez, F. (1991).** Inositol Phospho-oligosaccharide stimulates cell proliferation in the early developing inner ear. *Dev. Biol.* 143. 432-435.
- Vetter, D. E., Mann, J. R, Wangemann, P., Liu, J., Mc Laughlin, K. J., Lesage, F., Marcus, D. C., Lazdunski, M., Heinemann, S. F. and Barhanin, J. (1996).** Inner ear defects induced by null mutation of the *isk* gene. *Neuron* Vol 17, 1251-1264.
- Waelsh, S. G. (1991).** Genetics of hearing impairment. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 630, 3 - 5.
- Wagner, R. W. (1994).** Gene inhibition using antisense oligonucleotides. *Nature* Vol 372. 333-335.
- Wall, N. A. and Hogan, B. L. M. (1994).** *TGF- $\beta$*  related genes in development. *Curr. Op. Gen. & Dev.* 4. 517-522.
- Wangemann, P. (1995).** Comparison of ion transport mechanisms between vestibular dark cells and strial marginal cells. *Hearing Res.* 90. 149-157.
- Warchol, M. E., Lambert, P. R., Goldstein, B. J., Forge, A. and Corwin, J. (1993).** Regenerative proliferation in inner ear sensory epithelia from adult guinea pigs and humans. *Science*, Vol. 259. 1619-1621.
- Weibel, E. R. (1957).** Zur Kenntnis der Differenzierungsvorgänge im Epithel des Ductus cochlearis. *Acta anat.* 29, 53-90.
- Wilkinson, D. G, Bhatt, S. and Mc Mahon, A. (1989).** Expression pattern of the TGF related protooncogene *int-2* suggest multiple roles in fetal development. *Dev.* 105. 131-136.

**Wu, D. K. and Oh, S.-H. (1996).** Sensory organ generation in the chick inner ear. *Journ. of Neurosci.* 16 (20). 6454-6462.

**Xu, Q., Alldus, G., Holder, N. and Wilkinson, D. G. (1995).** Expression of the truncated *Sek-1* receptor tyrosine kinase disrupts the segmental restriction of gene expression in the xenopus and zebrafish hindbrain. *Development* 121. 4005-4016.

**Yamashita, H. and Oesterle, E. C. (1995).** Induction of cell proliferation in mammalian inner ear sensory epithelia by transformin growth factor  $\alpha$  and epidermal growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 92. 3152-3155.

**Yntema, C. L. (1950).** *J. Exp. Zool.* 113. 211.

**Zhang, M., Kim, H.-J., Marshall, H., Gendron-Maguire, M., Lucas, D. A., Baron, A., Gudas, L. J., Gridley, T., Krumlauf, R. and Grippo, J. F. (1994).** Ectopic *Hoxa-1* induces rhombomere transformation in mouse hindbrain. *Dev.* 120. 2431-2442.

**Zheng, J. L., Helbig, C. and Gao, W.-Q. (1997).** Induction of cell proliferation by fibroblast and insulin-like growth factors in pure rat inner ear epithelial cultures. *Journ. of Neurosci.* 17. 216-226.

## **6. Danksagung**

Ich danke Frau PD Dr. Eva Bober und Herrn Prof. Dr. H. G. Wolff, daß sie die vorliegende Arbeit vor der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät der Technischen Universität Braunschweig vertreten.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Eva Bober für die Bereitstellung des Themas. Ihre konstruktive Anleitung, ständige Diskussionsbereitschaft und freundschaftliche Zusammenarbeit haben wesentlich zur Durchführung dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Professor H.-H. Arnold danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für finanzielle Unterstützung. Dem Boehringer Ingelheim Fonds danke ich für die finanzielle Unterstützung, die hervorragende Betreuung und die Gelegenheit, meine Daten international präsentieren zu dürfen.

Allen Mitarbeitern der Abteilung Molekularbiologie, insbesondere Sonja Hoffmann und Heike Herbrandt, danke ich für die gute Zusammenarbeit, die fruchtbaren Diskussionen und die hilfreiche Unterstützung. Mein besonderer Dank gilt Konstanze Schäfer, mit der ich diese Zeit „durchlebt“ habe.

Charlotte Klaue danke ich für ihre unermüdliche, freundschaftliche Tätigkeit bei der Organisation bürokratischer Fragen am Arbeitsplatz und für hilfreiche Textkorrekturen. Mein Dank auch an Claudia Deterding, die die Tiere für mich hervorragend betreut hat und an Lore Wesemann für ihre unendliche Geduld mit uns "Forschern".

Ganz innig danke ich Thorsten Hadrys, für die gemeinsame Zeit, die vielen Gespräche und Ideen - die Zusammenarbeit hat mir sehr viel Spaß gemacht.

Weiterhin danke ich meinen Eltern Renate Wrobel und Axel Rinkwitz sowie Bärbel Rinkwitz, die, immer im richtigen Moment zur Seite, mich in jeder Hinsicht unterstützt haben. Auch Ilse und Arno Brandt möchte ich für ihre Unterstützung danken. Meinem Sohn Ole danke ich von ganzem Herzen, ohne sein Verständnis wäre die Durchführung dieser Arbeit sicherlich nicht möglich gewesen.

## ALLGEMEINE VERÖFFENTLICHUNGEN

### Publikationen:

**Hadrys, T., Braun, T., Rinkwitz-Brandt, S., Arnold, H.H. and Bober, E. (1998).** *Nkx5-1* controls semicircular canal formation in the mouse inner ear. *Development* 125. 33-39.

**Herbrand, H., Guthrie, S., Hadrys, T., Hoffmann, S., Arnold, H.H., Rinkwitz-Brandt, S. and Bober, E. (1998).** *cNkx5.1* homeobox gene and *Pax2* show different responses to local signals during otic placode and vesicle formation in the chick embryo. *Development*, in press.

### Tagungsbeiträge:

**Hadrys, T., Braun, T., Rinkwitz-Brandt, S., Arnold, H.H. and Bober, E..** *Nkx5-1* is required for the development of the semicircular canals in the mouse inner ear. 13th International Congress of Developmental Biology, Snowbird (Utah, USA), 5.-10. Juli 1997. Poster abstract. *Developmental Biology* Vol 186, page 334.

**Hadrys, T., Braun, T., Rinkwitz-Brandt, S., Arnold, H.H. and Bober, E..** *Nkx5-1* is required for the development of the semicircular canals in the mouse inner. 12. Tagung der Gesellschaft für Entwicklungsbiologie, Köln, 11.-14. März 1997. Poster Abstract, S. 120.

**Bober, E., Rinkwitz-Brandt, S., Hoffmann, S., Arnold, H.-H. and Guthrie, S..** Chicken *Nkx-5* gene represents an early marker of otic development. Congress of the European Developmental Biology Organisation, Toulouse, 09.-13.07.95. Poster abstract. S. 86.

**Rinkwitz-Brandt, S., Hadrys, T., Justus, M., Oldenettel, I., Hoffmann, S., Arnold, H.-H. and Bober, E..** *Nkx-5.1* and *Nkx-5.2* genes: regionally restricted expression in developing brain and inner ear. Edinburgh, Joint spring meeting 05.-08.04.94. Poster abstract, S. 85.